

Osmotisch bedingter Stress in *Bacillus subtilis*

**- C-di-AMP, der Regulator für die Aufnahme
osmotischer Schutzsubstanzen?**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Doreen Hinkel

aus Weimar (Thüringen)

Marburg, 2020

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg <http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Keine Bearbeitung
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/de/>

Die experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von Januar 2017 bis März 2020 im Laboratorium für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180) als
Dissertation angenommen am 05.10.2020.

Erstgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gert Bange

Tag der Disputation: 16.10.2020

**„Alle sagten das geht nicht. Und dann kam einer, der wusste das nicht, und
hat's einfach gemacht.“**

Unbekannter Verfasser

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1 Zusammenfassung | 9 |
| 2 Summary | 10 |
| 3 Einleitung | 11 |
| 3.1 Sekundäre Botenstoffe | 11 |
| 3.2 Zyklisches di-GMP - der Motilitätsregulator in <i>B. subtilis</i> | 12 |
| 3.3 Zyklisches di-AMP - das essenzielle Gift für <i>B. subtilis</i> | 12 |
| 3.3.1 Diadenylatzyklastasen - die Enzyme zur Produktion des essenziellen Dinukleotids | 13 |
| 3.3.2 Phosphodiesterasen - der Schutz vor Überakkumulation von c-di-AMP | 14 |
| 3.3.3 Kalium und Glutamat - Regulatoren der c-di-AMP Homöostase? | 15 |
| 3.4 Osmotisch bedingter Stress in Mikroorganismen | 16 |
| 3.5 Reaktion von <i>B. subtilis</i> bei hyperosmotischem Stress | 17 |
| 3.5.1 Kompatible Solute | 17 |
| 3.5.2 Synthese kompatibler Solute | 18 |
| 3.5.3 Aufnahme kompatibler Solute | 20 |
| 3.5.4 Struktur und Mechanismus der ABC-Transporter OpuA, OpuB und OpuC | 21 |
| 3.5.5 Die Besonderheit der Nukleotidbindedomänen von OpuA, OpuB und OpuC | 24 |
| 3.6 Die Rolle von c-di-AMP bei osmotisch bedingtem Stress in Bakterien | 25 |
| 3.7 Zielsetzung dieser Arbeit | 28 |
| 4 Material und Methoden | 29 |
| 4.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide | 29 |
| 4.1.1 Bakterienstämme | 29 |
| 4.1.2 Plasmide | 31 |
| 4.1.3 Oligonukleotide | 33 |
| 4.2 Materialien und Chemikalien | 37 |
| 4.3 Mikrobiologische Methoden | 37 |
| 4.3.1 Grundmedien | 37 |
| 4.3.2 Medienzusätze und kompatible Solute | 38 |
| 4.3.3 Sterilisation | 38 |
| 4.3.4 Kultivierung von Bakterien | 39 |
| 4.3.5 Ermittlung der Zelldichte | 39 |
| 4.3.6 Stammhaltung | 39 |
| 4.4 Molekularbiologische Methoden | 40 |
| 4.4.1 Präparation von genomischer DNA aus <i>B. subtilis</i> | 40 |
| 4.4.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 40 |
| 4.4.3 Amplifikation und Reinigung von DNA | 40 |
| 4.4.4 Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation von DNA | 40 |
| 4.4.5 Gibson Assembly | 40 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.4.6 | StarGate®- Klonierung | 41 |
| 4.4.7 | Agarose-Gelelektrophorese | 42 |
| 4.4.8 | Konzentrationsbestimmung von DNA | 42 |
| 4.4.9 | Gerichtete Mutagenese | 42 |
| 4.4.10 | Deletion von Genen mithilfe des Cre/lox Verfahrens | 43 |
| 4.4.11 | Sequenzierung | 44 |
| 4.4.12 | Transformation von <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i> | 44 |
| 4.4.12.1 | Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 44 |
| 4.4.12.2 | Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 45 |
| 4.4.12.3 | Transformation natürlich kompetenter <i>B. subtilis</i> Zellen | 45 |
| 4.5 | Biochemische Methoden | 45 |
| 4.5.1 | Nachweis der Amylase-Aktivität | 45 |
| 4.5.2 | Bestimmung der intrazellulären Prolin Konzentration | 45 |
| 4.5.3 | Bestimmung der intrazellulären c-di-AMP Konzentration | 46 |
| 4.6 | Proteinbiochemische Methoden | 46 |
| 4.6.1 | Heterologe Produktion von Proteinen | 46 |
| 4.6.2 | Reinigung von Proteinen mittels <i>Strep</i> -Tag Affinitätschromatografie | 47 |
| 4.6.3 | Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatografie an Amylose-Resin | 47 |
| 4.6.4 | Größenausschlusschromatografie | 48 |
| 4.6.5 | Konzentrationsbestimmung gereinigter Proteine | 48 |
| 4.6.6 | Proteinbestimmung von Zellextrakten | 48 |
| 4.6.7 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 49 |
| 4.6.8 | Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS) | 50 |
| 4.6.9 | <i>MicroScale Thermophoresis</i> (MST) | 51 |
| 4.7 | Elektronenmikroskopie | 51 |
| 4.7.1 | Rasterelektronenmikroskopie (REM) | 51 |
| 4.7.2 | Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) | 52 |
| 4.8 | Bioinformatische Methoden | 53 |
| 5 | Ergebnisse | 54 |
| 5.1 | Struktur-Modelle der <i>B. subtilis</i> OpuAA, OpuBA und OpuCA CBS Domänen | 54 |
| 5.2 | Sequenzanalyse der Opu CBS Domänen von <i>B. subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i> und <i>S. aureus</i> | 55 |
| 5.3 | Strukturelle Analyse der CBS Domänen der Opu Transporter aus <i>B. subtilis</i> | 56 |
| 5.4 | Biochemische Charakterisierung der CBS Domänen | 58 |
| 5.4.1 | Heterologe Produktion und Reinigung der Proteine | 58 |
| 5.4.2 | Bindet c-di-AMP an die CBS Domänen der drei Opu-Transporter? - Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS) | 60 |
| 5.4.3 | <i>MicroScale Thermophoresis</i> zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten der Wildtyp-Proteine | 62 |
| 5.4.4 | Mutationen in CBS-BA und deren Auswirkung auf die Bindung von c-di-AMP | 64 |
| 5.5 | Bedeutung der CBS Domänen für Funktion der Opu Transporter <i>in vivo</i> | 70 |
| 5.5.1 | Analyse der OpuBA CBS-Mutanten <i>in vivo</i> | 70 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 5.5.2 | Funktion des Transporters OpuB ohne CBS Domänen | 71 |
| 5.5.3 | Rolle des Mediums für die Analyse der Funktion der CBS Domänen | 73 |
| 5.5.3.1 | Einfluss der Stickstoffquelle und der Kaliumkonzentration auf das Wachstum | 74 |
| 5.5.3.2 | Wachstum der $\Delta proHJ$ Mutante bei 1,2 M NaCl | 75 |
| 5.5.3.3 | Funktionstest der Opu Transporter in Natrium-SMM | 77 |
| 5.6 | c-di-AMP Konzentrationen in <i>B. subtilis</i> | 79 |
| 5.6.1 | Werte aus der Literatur | 79 |
| 5.6.2 | Bestimmung der c-di-AMP Konzentration bei verschiedenen Salzkonzentrationen | 80 |
| 5.6.3 | Bestimmung der c-di-AMP Konzentrationen in den Diadenylatzyklase- Deletionsmutanten | 81 |
| 5.7 | Exkurs: Bestimmung des Zytoplasmavolumens von <i>B. subtilis</i> | 84 |
| 5.7.1 | Bestimmung des Gesamtzellvolumens mittels Rasterelektronenmikroskopie | 85 |
| 5.7.2 | Bestimmung der Zellwanddicke mittels Transmissionselektronenmikroskopie | 86 |
| 5.7.3 | Zusammenfassung und Auswertung der Daten | 88 |
| 6 | Diskussion & Ausblick | 90 |
| 6.1 | Obwohl strukturell sehr ähnlich, bindet c-di-AMP nur an zwei der drei Opu CBS Domänen | 90 |
| 6.2 | Einige Aminosäuren von CBS-BA sind essenziell für die Bindung an c-di-AMP | 92 |
| 6.3 | Das experimentelle Setup für die <i>in vivo</i> Analyse der CBS Domänen ist von besonderer Bedeutung | 94 |
| 6.4 | c-di-AMP Konzentrationen in der <i>B. subtilis</i> Zelle - ein kritischer Punkt in Hin- blick auf c-di-AMP bindende Zellkomponenten | 98 |
| 6.4.1 | Bedeutung der c-di-AMP Konzentrationen für die Regulation von Kaliumho- möstase und Aufnahme kompatibler Solute | 98 |
| 6.5 | Ein verringerte c-di-AMP Konzentration hat keinen (sichtbaren) Einfluss auf die Osmoadaption | 99 |
| 6.6 | Ausblick: c-di-AMP - der ultimative Osmoregulator? | 102 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 104 |
| 8 | Anhang | 120 |
| 9 | Danksagung | 127 |
| 10 | Erklärung | 128 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| ABC | ATP-Bindekassette (<i>ATP-binding cassette</i>) |
| AHT | Anhydrotetracyclin |
| Amp ^R | Ampicillin-Resistenz |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare (<i>base pair</i>) |
| BCCT | Betaine-Choline-Carnitine Transporter |
| c-di-AMP | Bis - (3',5') zyklisches Di - Adenosinmonophosphat |
| c-di-GMP | Bis - (3',5') zyklisches Di - Guanosinmonophosphat |
| Cml ^R | Chloramphenicol-Resistenz |
| C-terminal | Carboxy-terminal |
| DAC | <i>diadenylate cyclase</i> |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMG | Dimethylglycin |
| DMSA | Dimethylsulfonioacetat |
| DMSP | Dimethylsulfoniumpropionat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| <i>et al.</i> | und andere, <i>et alii</i> (lateinisch) |
| <i>x g</i> | mittlere Erdbeschleunigung (= 9,81 m/s ²) |
| HABA | 4-Hydroxyazobenzol-2-Carboxy-Säure |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| Kan ^R | Kanamycin-Resistenz |
| K _D | Dissotiationskonstante |
| KPP | Kalium-Phosphat-Puffer |
| LB | Luria Bertani |
| MBP | Maltosebindeprotein |
| MMA | Minimalmedium A |
| NPP | Natrium-Phosphat-Puffer |
| N-terminal | Amino-terminal |
| NBD | Nukleotidbindedomäne |
| OD ₅₇₈ | Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| PDB | Protein Data Bank |

| | |
|------------------|--|
| RBS | Ribosomenbindestelle |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SMM | Spizizen's Minimal-Medium |
| SSS | Natrium/Solut Symporter (<i>sodium/solute symporter</i>) |
| SBP | Substratbindeprotein (substrate-binding protein) |
| TAE | Tris-HCl/Acetat/EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TMD | Transmembrandomäne (transmembrane domain) |
| Tris | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol |
| U | units |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumen pro Volumen (volume per volume) |
| w/v | Gewicht pro Volumen (weight per volume) |
| WT | Wildtyp |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid |
| Zeo ^R | Zeocin-Resistenz |

Aminosäuren Einbuchstabencode:

| | | | | | | | |
|---|----------------|---|---------------|---|--------------|---|------------|
| A | Alanin | Q | Glutamin | L | Leucin | S | Serin |
| R | Arginin | E | Glutaminsäure | K | Lysin | T | Threonin |
| N | Asparagin | G | Glycin | M | Methionin | W | Tryptophan |
| D | Asparaginsäure | H | Histidin | F | Phenylalanin | Y | Tyrosin |
| C | Cystein | I | Isoleucin | P | Prolin | V | Valin |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----|--|----|
| 1 | Schematische Darstellung der Diadenylatzyklasten CdaA, DisA und CdaS | 13 |
| 2 | Schematische Darstellung der Phosphodiesterasen GdpP und PgpH | 15 |
| 3 | Prolinsynthese in <i>B. subtilis</i> | 18 |
| 4 | Substratspektrum der Opu Transporter aus <i>B. subtilis</i> | 20 |
| 5 | Struktur von Typ 1 und Typ 2 ABC Importern | 22 |
| 6 | Mechanismus eines Typ 1 ABC Importers | 23 |
| 7 | Besonderheit der Nukleotidbindedomänen der <i>B. subtilis</i> Opu Transporter | 25 |
| 8 | Vorgehen bei der markerlosen Deletion von Genen mithilfe der Cre-Rekombinase | 44 |
| 9 | Sequenzalignment der CBS Domänen der Opu Transporter von <i>B. subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i> und <i>S. aureus</i> | 56 |
| 10 | Struktur der CBS Domänen der NBD OpuCA aus <i>L. monocytogenes</i> mit dem Liganden c-di-AMP | 57 |
| 11 | Overlay der drei <i>B. subtilis</i> CBS Modelle mit der Struktur von CBS-CA von <i>L. monocytogenes</i> | 57 |
| 12 | Heterologe Produktion der CBS Domänen und NBD der <i>B. subtilis</i> Opu Transporter in <i>E. coli</i> BL21(DE3) | 59 |
| 13 | Reinigung der Fusionsproteine MalE-OpuAA und MalE-CBS-CA | 59 |
| 14 | Konformationsänderungen durch die Bindung von c-di-AMP an die CBS Domäne von OpuBA | 61 |
| 15 | Änderungen im HDX zwischen apo- und c-di-AMP gebundenen Zustand für CBS-BA und -CA anhand der Struktur von <i>L. monocytogenes</i> | 62 |
| 16 | Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) für die CBS Domänen der <i>B. subtilis</i> Opu Transporter | 63 |
| 17 | Negativkontrollen der <i>MicroScale Thermophoresis</i> | 63 |
| 18 | Sequenzalignment der Opu CBS Domänen von <i>B. subtilis</i> und <i>L. monocytogenes</i> mit Mutationen | 64 |
| 19 | Übersicht aller Aminosäuren in der CBS Domäne von OpuBA, welche im Rahmen dieser Arbeit mutiert wurden | 65 |
| 20 | Auswirkung einer Mutation von Valin261 | 66 |
| 21 | Auswirkung einer Mutation von Serin283 | 67 |
| 22 | Wichtigkeit des aromatischen Rings von Tyrosin343 für die Bindung an c-di-AMP | 67 |
| 23 | Weitere Mutationen an Lysin342 und Tyrosin343 | 68 |
| 24 | Auswirkungen einer Mutation von Arginin359 | 69 |
| 25 | Auswirkungen einer Mutation von Aspartat im Interface zwischen den beiden CBS Monomeren | 69 |
| 26 | Osmoprotektionsassay der CBS Mutanten des Transporters OpuB | 70 |
| 27 | Funktion der CBS Domänen für den Transporter OpuB | 72 |
| 28 | Test von verschiedenen Stickstoffquellen und Kaliumkonzentrationen beim Wachstum unter osmotischem Stress (1,2 M NaCl) | 75 |
| 29 | Vergleich der intrazellulären Prolinkonzentration in <i>B. subtilis</i> in SMM und Natrium-SMM | 76 |

| | | |
|----|---|-----|
| 30 | Wachstum der $\Delta proHJ$ Mutante in Natrium-SMM mit verschiedenen Kalium- und Glutamatkonzentrationen | 77 |
| 31 | Test der Funktion der Opu Transporter in Natrium-SMM | 78 |
| 32 | C-di-AMP und Prolin Konzentrationen in <i>B. subtilis</i> JH642 und 168 bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen im Medium | 81 |
| 33 | C-di-AMP und Prolin Konzentrationen in den Diadenylatzyklase Deletionsmutanten | 83 |
| 34 | Wachstumsraten der Diadenylatzyklase Deletionsmutanten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen | 83 |
| 35 | Bestimmung des Gesamtzellvolumens durch Rasterelektronenmikroskopie (REM) | 86 |
| 36 | Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) Bilder von <i>B. subtilis</i> Zellen | 87 |
| 37 | Schematische Darstellung der <i>B. subtilis</i> Zellen bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen | 88 |
| 38 | Zusammenhang zwischen der Bindung von c-di-AMP und der Transporterfunktion von <i>L. monocytogenes</i> OpuCA | 95 |
| 39 | Die <i>B. subtilis</i> Zelle in der Welt von Osmoregulation und c-di-AMP | 102 |
| 40 | Konformationsänderungen durch die Bindung von c-di-AMP an die CBS Domäne von OpuCA | 120 |
| 41 | Die CBS-Domäne von OpuAA koordiniert kein c-di-AMP | 121 |
| 42 | Die CBS-Domäne von OpuCA koordiniert kein c-di-GMP | 122 |
| 43 | Schematische Darstellung der Deletion der CBS Domänen in OpuBA und OpuCA | 123 |
| 44 | Funktion der CBS Domänen für den Transporter OpuC | 123 |
| 45 | Test von verschiedenen Stickstoffquellen beim Wachstum unter osmotischem Stress (1,2 M NaCl) | 124 |
| 46 | TEM Bilder von <i>B. subtilis</i> nach Wachstum in SMM | 125 |
| 47 | TEM Bilder von <i>B. subtilis</i> nach Wachstum in SMM + 1 mM Glycinbetain. | 125 |
| 48 | TEM Bilder von <i>B. subtilis</i> nach Wachstum in SMM + 1,2 M NaCl | 126 |
| 49 | TEM Bilder von <i>B. subtilis</i> nach Wachstum in SMM + 1,2 M NaCl + 1 mM Glycinbetain. | 126 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|----|---|----|
| 1 | In dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i> Stämme | 29 |
| 2 | In dieser Arbeit verwendete <i>B. subtilis</i> Stämme aus der Stammsammlung AG Bremer | 29 |
| 3 | In dieser Arbeit konstruierte <i>B. subtilis</i> Stämme. | 30 |
| 4 | Bereits vorhandene Plasmide aus der Stammsammlung der AG Bremer | 31 |
| 5 | In dieser Arbeit konstruierte Plasmide | 32 |
| 6 | In dieser Arbeit konstruierte Plasmide (Fortsetzung) | 33 |
| 7 | Verwendete Oligonukleotide | 33 |
| 8 | Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung) | 34 |
| 9 | Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung) | 35 |
| 10 | Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung) | 36 |
| 11 | Minimalmedium A für <i>E. coli</i> | 37 |
| 12 | Minimalmedium für <i>B. subtilis</i> | 38 |
| 13 | Verwendete Antibiotika und Medienzusätze | 38 |
| 14 | Zusammensetzung des 5x Isothermalen Reaktionsmixes und des Gibson Reak- tionsmixes für das Gibson Assembly | 41 |
| 15 | Reaktionsansätze für die StarGate®- Klonierung | 42 |
| 16 | Puffer für SDS-Gele und deren Zusammensetzung | 49 |
| 17 | Herstellung von zwei 12 %igen SDS-Minigelen | 49 |
| 18 | Ergebnisse der Suche nach homologen Strukturen zu den <i>B. subtilis</i> Opu CBS Domänen durch den Online Server Phyre ² | 55 |
| 19 | Sequenzidentitäts-Matrix der CBS Domänen von <i>B. subtilis</i> (<i>Bs</i>), <i>L. monocyto-</i> <i>genes</i> (<i>Lm</i>) und <i>S. aureus</i> (<i>Sa</i>) | 56 |
| 20 | Theoretische Werte für Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient für die MalE- CBS Fusionsproteine | 60 |
| 21 | Ergebnisse der <i>MicroScale Thermophoresis</i> für die CBS-BA Mutanten | 66 |
| 22 | Wachstumsraten der Stämme mit OpuB oder OpuC ± CBS Domäne | 72 |
| 23 | Vergleich der Minimalmedien SMM, MSMM und Natrium-SMM für <i>B. subtilis</i> . . . | 74 |
| 24 | Berechnete Werte für das Gesamtzellvolumen von <i>B. subtilis</i> anhand von REM Bildern | 86 |
| 25 | Messungen der Zellwanddicke mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) | 87 |
| 26 | Zusammenfassung der Daten aus REM und TEM | 88 |
| 27 | Bestimmung des zytoplasmatischen Volumens für <i>B. subtilis</i> JH642 in 1 mL OD ₅₇₈ = 1. | 89 |
| 28 | Gemessene Dissociationskonstanten für verschiedene c-di-AMP Targets in <i>B.</i> <i>subtilis</i> | 99 |

1 Zusammenfassung

Bacillus subtilis ist durch seinen Lebensraum in den oberen Schichten des Bodens sich ständig ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt. Für die Anpassung an hochosmolare Bedingungen nutzt *B. subtilis* die *salt-out* Strategie. Dafür ist die Akkumulation (durch Aufnahme und Synthese) von kompatiblen Soluten, ein essenzieller Schritt. Für die Aufnahme gibt es in *B. subtilis* verschiedene Transporter, wobei drei davon zu den ABC Transportern gehören (OpuA, OpuB und OpuC). Eine Besonderheit dieser ABC Transporter ist die regulatorische CBS Domäne am C-Terminus der ATPase, welche durch Spaltung von ATP den Transport katalysiert. In anderen homologen Transportern konnte gezeigt werden, dass diese Domäne mit dem Second Messenger c-di-AMP interagiert und vermutlich den Transport dadurch abschaltet. C-di-AMP ist insofern interessant, als dass es sowohl in *B. subtilis* als auch in nahe verwandten Organismen die Kaliumaufnahme, den ersten Schritt der *salt-out* Strategie reguliert.

In dieser Arbeit konnten zunächst die CBS Domänen der drei Transporter erfolgreich heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und gereinigt werden. Im Anschluss daran konnte *in vitro* mittels zwei verschiedener Methoden gezeigt werden, dass c-di-AMP an die CBS Domänen von OpuB und OpuC, jedoch nicht an die von OpuA bindet. Die Werte für die Affinität von c-di-AMP zu den CBS Domänen lag für beide Systeme Werte im niederen mikromolaren Bereich. Des Weiteren wurden mittels gerichteter Mutagenese in der CBS-Domäne von OpuB Mutanten erzeugt um zu determinieren, welche Aminosäuren an der Bindung beteiligt sind. Es wurden einige interessante Mutanten gefunden, welche *in vitro* kein c-di-AMP mehr binden.

In vivo zeigte sich bei Osmoprotektionsassays zunächst, dass die *in vitro* getesteten Mutanten keinen Einfluss auf die Funktionsweise des Transporters bei Salzstress im Vergleich zum Wildtyp haben. Auch ein *B. subtilis* Stamm, welcher OpuB oder OpuC ohne CBS Domäne exprimiert, zeigte keinen veränderten Phänotyp im Wachstum. Eine Analyse des Minimalmediums, welches standardmäßig für *B. subtilis* verwendet wird, deutete darauf hin, dass die hohe Kaliumkonzentration ein Problem für die eben genannten Wachstumsexperimente sein könnte. Im Verlauf dieser Arbeit konnte keine Mediumzusammensetzung gefunden werden, die eine definiert geringe Menge Kalium enthält und ein Wachstum von *B. subtilis* unter hochosmolaren Bedingungen erlaubt. Damit konnte die vorausgesagte Funktion von c-di-AMP bei der Bindung an die CBS Domänen *in vivo* weder bestätigt noch widerlegt werden.

In einem zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die c-di-AMP Konzentration in *B. subtilis* im oben genannten Minimalmedium im niedrigen mikromolaren Bereich liegt und sich bei hyperosmotischem Stress nicht signifikant verändert. Kombinationen von Knock-Outs der c-di-AMP synthetisierenden Enzyme führten teilweise zu einer Reduktion der c-di-AMP Konzentration. Es konnte allerdings nicht gezeigt werden, ob eines der Enzyme bei Salzstress eine gesonderte Rolle spielt.

Diese Arbeit liefert damit eine erste Tendenz, inwiefern c-di-AMP bei der Regulation der Aufnahme von kompatiblen Soluten eine Rolle spielt und zeigt, dass es ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren ist, welche bei der Adaption an Salzstress zum Tragen kommen.

In einem kleinen Exkurs des Projekts wurde das zytoplasmatische Volumen von *B. subtilis* mittels verschiedener Mikroskopie-Techniken bestimmt. Salzstress in Form von 1,2 M NaCl führt zu einer Verkleinerung der Zellen insgesamt, aber interessanterweise zu einer Verdickung der Zellhülle. Dieser Effekt kann durch die Zugabe des kompatiblen Solut Glycinbetain vermieden werden. Für die einzelne Zelle bedeutet das, dass Konzentrationen beispielsweise von c-di-AMP oder kompatiblen Soluten dadurch wesentlich höher sind, als unter der Annahme, dass das zytoplasmatische Volumen relativ gleich bleibt unabhängig von der Osmolarität der Umgebung.

2 Summary

Due to its natural habitat in the upper layers of the soil, *Bacillus subtilis* has to cope with permanent changing environmental conditions. *B. subtilis* utilizes the so-called *salt-out* strategy to adapt to a hyperosmotic environment with high salt concentrations. For this, the accumulation of so-called compatible solutes (little water-soluble compounds) is of particular importance. For the uptake, *B. subtilis* possesses different transporters, three of them belonging to the substrate binding protein dependent ABC transporters (OpuA, B and C). A special feature of these three transporters is the regulatory CBS domain at the C terminus of the nucleotide-binding domain, which catalyzes the transport by hydrolysis of ATP. In homologue transporters of other organisms there has been shown before, that these CBS domains interact with the second messenger cyclic di-AMP. Probably, this binding results in a switch-off of the transport activity. Cyclic di-AMP is of particular interest because it is in *B. subtilis* as well as in other organisms involved in the uptake of potassium, the first step of the *salt-out* strategy.

During this work, the CBS domains of the three transporters could successfully be produced in *E. coli* and also the subsequent purification was successful. With the help of two different methods it could be shown *in vitro* that c-di-AMP binds to the CBS domains of OpuB and OpuC but not to this of OpuA. The determination of the affinity of the CBS domains towards c-di-AMP resulted in values within the lower micromolar range. Using site-directed mutagenesis, there could amino acids be detected which seem to be essential for binding. Some interesting mutants have been found which do not bind c-di-AMP anymore.

During osmoprotection experiments it was shown, that the *in vitro* tested mutants have no influence of the functionality of the transporter in comparison to the wild type. Also a strain which expresses either OpuB or OpuC without a CBS domain did not exhibit an alternated growth phenotype. An analysis of the minimal medium, which is usually used for *B. subtilis*, revealed that the high potassium concentration might be a problem for the growth experiments mentioned above. During this work it was not possible to find a medium composition with a low potassium concentration which is usable for growth of *B. subtilis* under high osmolarity. In a second part of this work it could be shown that the c-di-AMP concentration in a *B. subtilis* cell is within the lower micromolar range. Furthermore, there is no significant change of the concentration during growth under high osmolarity. Combinations of knock-outs of the enzymes synthesizing c-di-AMP showed reduced c-di-AMP concentrations. But it could not be revealed if one of the enzyme has a particular role during adaption to hyperosmotic conditions.

In the end, this work gives a first hint, how c-di-AMP is involved in the regulation of the uptake of compatible solutes. Additionally, it is shown that during adaption to salt stress many factors are involved and are working together.

For a little side project of this work, the cytoplasmatic volume of *B. subtilis* has been determined using different microscopy techniques. Interestingly, salt stress with 1.2 molar NaCl resulted in much smaller cells but also in a swelling of the cell envelope. This effect could be avoided if glycine betaine as compatible solute was used. These results are of particular importance for single cells. For example, the concentrations of c-di-AMP and other compounds are much higher than with the assumption that the cytoplasmatic volume remains similar independently of the external osmolarity.

3 Einleitung

Bacillus subtilis ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges Bakterium, welches vor allem in den oberen Schichten des Bodens vorkommt. Dort existiert es entweder als motile Zelle, als dormante Endospore oder ist auch in der Lage komplexe Biofilme zu bilden. Wie auch andere Organismen in diesem Lebensraum, ist *B. subtilis* dort ständig sich ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt. Vor allem Schwankungen in Nährstoffgehalt, Sauerstoffverfügbarkeit, Temperatur, pH-Wert sowie Feuchtigkeit und Trockenheit des Bodens müssen kompensiert werden (Mandic-Mulec et al., 2015). Diese extrazellulären Signale werden auch als primäre Boten bzw. primäre Messenger (englisch: first messenger) bezeichnet. Primäre Messenger interagieren nicht direkt mit Komponenten in der Zelle, sondern werden zunächst von Rezeptoren auf der Zelloberfläche wahrgenommen. Rezeptoren sind zum Beispiel Ionenkanäle, G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder Transmembranproteine (Kodis et al., 2012). Durch verschiedene Signal-Kaskaden werden in der Zelle sogenannte sekundäre Botenstoffe (englisch: second messenger) aktiviert bzw. deren Konzentration verändert. Diese lösen durch eine Interaktion mit Proteinen, DNA oder RNA Molekülen eine Zellantwort auf die sich verändernde Umweltbedingung aus (Lodish et al., 2000).

3.1 Sekundäre Botenstoffe

Sekundäre Botenstoffe kommen nicht nur in Bakterien, sondern in allen drei Domänen des Lebens vor. Es können sowohl anorganische Ionen, Gase, Lipid-Derivate als auch Nukleotid-basierte Moleküle sein. Mit zyklischem 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) wurde in den Sechzigerjahren des letzten Jahrhunderts der erste Vertreter der Nukleotid-basierten second messenger in eukaryotischen Zellen der Leber entdeckt (Rall und Sutherland, 1958). Einige Jahre später wurde cAMP auch im Modellorganismus *Escherichia coli* (Makman und Sutherland, 1965) und in *Brevibacterium liquefaciens* (Okabayashi et al., 1963) gefunden. Im Zuge dieser Forschungen fand man heraus, dass cAMP in *E. coli* eine Rolle im Zuckerstoffwechsel spielt, indem es bei Anwesenheit von Glukose im Medium verhindert, dass andere Zucker wie zum Beispiel Laktose, Galaktose, Arabinose oder Maltose verstoffwechselt werden können (Ullmann und Monod, 1968). Heute weiß man, dass in *E. coli* die Bindung von cAMP an sein Target CAP (catabolite activator protein oder cAMP receptor protein) die Transkription von mehr als 100 Genen aktiviert (Ebright, 1993; Kolb et al., 1993; Busby und Ebright, 1997). Die Tatsache, dass cAMP sowohl im Proteobakterium *E. coli* als auch im Aktinobakterium *B. liquefaciens* vorkommt, lässt vermuten, dass dieser Second Messenger im Phylum Bacteria weit verbreitet ist. Allerdings ist zum Beispiel *B. subtilis*, welcher zu den Firmicuten mit niedrigem GC-Gehalt gehört, nicht in der Lage, cAMP zu synthetisieren. Die Forschung seit der Entdeckung von cAMP brachte in den letzten Jahren und Jahrzehnten immer mehr Nukleotid-basierte Second Messenger hervor, darunter die cyclischen Di-Nukleotide c-di-AMP (Corrigan und Gründling, 2013), c-di-GMP (Ross et al., 1987; Amikam und Benziman, 1989) sowie die Hybrid-Formen c-AMP-GMP (Davies et al., 2012) und c-GMP-AMP (Civril et al., 2013). Bis - (3',5') - zyklisches di -Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) wurde zunächst als Aktivator der membrangebundenen Cellulose-Synthese in *Gluconacetobacter xylinus* identifiziert (Ross et al., 1987) und seitdem

intensiv, vor allem in Gram-negativen Bakterien, studiert. Heute ist bekannt, dass es in vielen Organismen die Lebensweise reguliert. Ein hohes c-di-GMP Level begünstigt die Bildung von Biofilmen, während ein niedriges Level eine planktonische Lebensweise ermöglicht (Simm et al., 2004; Jenal und Malone, 2006; Hengge, 2009). In manchen Bakterien beeinflusst c-di-GMP auch die Expression von Virulenz-Genen (Dow et al., 2006; Ryan et al., 2006).

3.2 Zyklisches di-GMP - der Motilitätsregulator in *B. subtilis*

Zyklisches c-di-GMP, dessen Funktionen in den letzten Jahrzehnten schon in vielen Gram-negativen Bakterien charakterisiert wurde, wird auch von *B. subtilis* als Second Messenger genutzt. Wie auch in Gram-negativen, wird der Auf-und Abbau von c-di-GMP in *B. subtilis* von Diguanylatzyklasen (DGCs) bzw. Phosphodiesterasen (PDEs) reguliert. Allerdings ist das System in *B. subtilis* weniger komplex als zum Beispiel in *E. coli*, da es nur drei DGCs (DgcK, DgcP und DgcW) für die Bildung von c-di-GMP aus zwei Molekülen GTP und nur eine PDE (PdeH) für die Hydrolyse zu 5'-phosphoguanylyl - (3',5') - Guanosin (pGpG) gibt (Chen et al., 2012). Erste Studien deuteten darauf hin, dass c-di-GMP für *B. subtilis* nicht essenziell ist und auch in großen Mengen nicht toxisch, da es möglich ist, in einem Stamm alle DGCs gleichzeitig oder die einzige PDE zu deletieren. Des Weiteren zeigte sich zunächst, dass ein hohes c-di-GMP Level in der Zelle zwar die Schwarm-Motilität über das Rezeptor-Protein DgrA negativ beeinflusst aber nicht direkt die Biofilmbildung reguliert (Gao et al., 2013). Jüngere Analysen von c-di-GMP Targets zeigten jedoch, dass c-di-GMP über sein putatives Rezeptor-Protein YdaK indirekt Einfluss auf die Biofilmbildung hat, da es die Produktion eines putativen Exopolysaccharids durch das *ydaJ-N* Operon positiv beeinflusst (Bedrunka und Graumann, 2017a, Bedrunka und Graumann, 2017b). In diesem komplexen Netzwerk von DGCs, der PDE und den verschiedenen Targets stellt sich natürlich die Frage, inwiefern eine Spezifität sichergestellt werden kann. Lokalisationsstudien in *B. subtilis* und auch anderen Organismen zeigten, dass die c-di-GMP Level sich nicht global verändern, sondern dass es vielmehr lokale Pools, zum Beispiel im Bereich der Zellmembran, gibt und die DGCs teilweise direkt mit den Target-Proteinen interagieren (Merritt et al., 2010; Zhu et al., 2016; Kunz et al., 2020).

3.3 Zyklisches di-AMP - das essenzielle Gift für *B. subtilis*

Während die Funktion des Sekundärmetabolits c-di-GMP in vielen Organismen seit einigen Jahrzehnten schon ausführlich untersucht wurde, erschien Bis - (3',5') zyklisches Di - Adenosinmonophosphat (c-di-AMP) erst vor circa 12 Jahren erstmals in der Liste der Sekundärmetabolite. c-di-AMP wurde zufällig entdeckt bei der biochemischen Analyse des Proteins DisA aus *Thermotoga maritima* und dessen Homolog aus *B. subtilis* (Witte et al., 2008).

c-di-AMP ist insofern interessant, als dass es der einzige Second Messenger ist, der für einige Bakterien unter Standardbedingungen (Vollmedium) essenziell ist, darunter *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Listeria monocytogenes* (Luo und Helmann, 2012; Whiteley et al., 2015; Chaudhuri et al., 2009). Für *B. subtilis* wird c-di-AMP verzichtbar, wenn er in einem definiertem Minimalmedium kultiviert wird (Gundlach et al., 2017b). Allerdings sind auch zu hohe c-di-AMP Level toxisch für die Zelle (Gundlach et al., 2015). Aus diesem Gründen wird c-di-AMP auch als *Essential Poison*, auf Deutsch *Essenzielles Gift*, bezeichnet.

3.3.1 Diadenylatzyklasten - die Enzyme zur Produktion des essenziellen Dinukleotids

Analog wie für c-di-GMP, gibt es in *B. subtilis* auch verschiedene Enzyme welche c-di-AMP auf- bzw. abbauen. Alle sogenannten Diadenylatzyklasten haben die DAC (**di**adenylate **cyl**case) Domäne gemeinsam, welche die Bildung von einem Molekül c-di-AMP aus zwei Molekülen ATP unter der Abspaltung von Pyrophosphat katalysiert (Romling, 2008). Insgesamt wurden in Bakterien bisher fünf Typen von Diadenylatzyklasten charakterisiert: DisA, CdaA, CdaS, CdaM und CdaZ (Corrigan und Gründling, 2013; Commichau et al., 2018). Während viele Bakterien nur entweder DisA oder CdaA besitzen, besitzt *B. subtilis* wie auch die anderen Mitglieder der Sporen bildenden Gattung *Bacillus* die drei Zyklasten DisA, CdaA und CdaS (siehe Abb. 1).

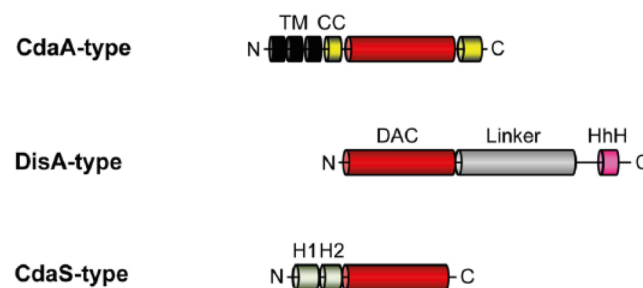


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Diadenylatzyklasten CdaA, DisA und CdaS. Die DAC Domäne ist jeweils in rot markiert. TM = Transmembranhelix, CC = Coiled coil Domäne, HhH = Helix-Haarnadel-Helix Motiv. Abbildung modifiziert nach Commichau et al., 2018.

Das bereits oben erwähnte DisA (DNA scanning protein A) ist ein Protein, welches an die DNA bindet und diese auf Schäden untersucht. Werden Schäden wahrgenommen, führt dies zu einer reduzierten DisA Aktivität, damit zu einem niedrigerem c-di-AMP Level und die Sporulation verzögert sich (Bejerano-Sagie et al., 2006). Eine ähnliche Rolle scheint DisA auch bei auskeimenden Sporen zu spielen (Raguse et al., 2017; Valenzuela-Garcia et al., 2018). Die DAC Domäne befindet sich in DisA am N-Terminus woraufhin in Richtung C Terminus ein Linker und eine Helix-Haarnadel-Helix Struktur folgen, wobei letztere an die DNA bindet. DisA bildet ein Homo-Octamer und benötigt für seine Aktivität entweder Magnesium oder Mangan als Cofaktor (Witte et al., 2008; Müller et al., 2015). Inwiefern die verminderte c-di-AMP Konzentration sich global in der Zelle zum Beispiel auf die Verzögerung der Sporulation auswirkt, ist allerdings bisher nicht bekannt.

CdaA bildet die am weitesten verbreitete Klasse von c-di-AMP aufbauenden Enzymen, da man es sowohl in den meisten Firmicuten als auch in denjenigen Gram-negativen Bakterien findet, welche c-di-AMP bilden, mit Ausnahme von Gammaproteobakterien wie zum Beispiel *E. coli*. CdaA ist N-terminal über drei Transmembranhelizes in der Zytoplasmamembran verankert und die sich in der Zelle befindende DAC Domäne wird an beiden Seiten von einer Doppelwendelstruktur (*coiled coil* Struktur) flankiert. Auch für die Aktivität von CdaA wird ein Cofaktor in Form von Kobalt oder Mangan benötigt (Rosenberg et al., 2015). In den Firmicuten wird CdaA gemeinsam in einem Operon mit seinem Regulator CdaR und der Phosphoglukosaminmutase GlmM kodiert (Mehne et al., 2013). Das Membranprotein CdaR interagiert mit CdaA (Gund-

lach et al., 2015) und inhibiert dessen Aktivität in *S. aureus* und *L. monocytogenes* (Bowman et al., 2016; Rismondo et al., 2015). GlmM ist ein essenzielles Protein für *B. subtilis*, welches die Synthese eines Precursors für Peptidoglykan katalysiert. Diese Tatsache, dass sich eine Diadenylatzyklase in einem Operon mit Enzymen befindet, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind, deutet bereits darauf hin, dass c-di-AMP mit in der Regulation der Zellwandsynthese involviert ist. Dafür spricht auch die Tatsache, dass leicht erhöhte c-di-AMP Level dazu führen, dass *B. subtilis* resistent gegenüber Antibiotika ist, welche die Zellwandsynthese angreifen (Luo und Helmann, 2012).

CdaS ist eine Diadenylatzyklase, welche nur während der Sporulation exprimiert wird und existiert nur in *B. subtilis* und nahe verwandten Bakterien. N-terminal von dessen DAC Domäne befinden sich zwei Helizes, welche die Oligomerisierung des Proteins regulieren: Während CdaS inaktiv als Hexamer vorliegt, wird es für seine Aktivität zum Dimer. Während der Sporulation sorgt CdaS für eine effiziente Keimung, allerdings sind die Mechanismen, die dessen Aktivität auslösen, bisher unbekannt (Mehne et al., 2013; Mehne et al., 2014).

Durch das Vorhandensein von drei Diadenylatzyklasen in *B. subtilis* stellt sich die Frage, inwiefern diese zusammen agieren und wie welches Enzym bestimmte Prozesse in der Zelle reguliert. Dadurch, dass CdaS exklusiv während der Sporulation aktiv ist, regulieren CdaA und DisA den c-di-AMP Pool in *B. subtilis* während des exponentiellen Wachstums. Die Lokalisation von CdaA in der Membran und von DisA an der DNA könnte darauf hindeuten, dass CdaA einen spezifischen Pool für die Regulation der Zellwandsynthese aufbaut und DisA durch die Synthese von c-di-AMP DNA Integrität und Reparatur kontrolliert. Dadurch, dass c-di-AMP auch an der Kaliumhomöostase beteiligt ist, müssten beide Enzyme allerdings auch zusammen agieren. Darauf wird in den folgenden Kapiteln weiter eingegangen.

3.3.2 Phosphodiesterasen - der Schutz vor Überakkumulation von c-di-AMP

Ähnlich wie für c-di-AMP synthetisierende Enzyme, gibt es in *B. subtilis* verschiedene Enzyme, welche c-di-AMP abbauen, die sogenannten Phosphodiesterasen. Neben den Phosphodiesterasen GdpP und PgpH in *B. subtilis* gibt es in anderen Organismen noch den Typ DhhP und CdnP. Allerdings sind es hier abhängig vom Typ des Enzyms unterschiedliche Domänen, welche den Abbau katalysieren (siehe Abb. 2).

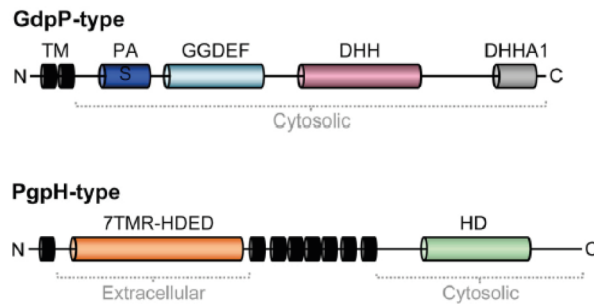


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Phosphodiesterasen GdpP und PgpH. TM = Transmembranhelix, PAS = Per-Arnt-Sim Domäne, GGDEF = (degenerierte) GGDEF Domäne, DHH = DHH Domäne, DHHA1 = DHHA1 Domäne, 7TMR-HDED = 7 Transmembranhelices-HDED Domäne, HD = HD Domäne. Abbildung modifiziert nach Commichau et al., 2018.

GdpP wurde zunächst in *Lactococcus lactis* beschrieben (Rallu et al., 2002). Während GdpP in *L. lactis* Säureresistenz verursacht (Smith et al., 2012), verändert es in pathogenen Spezies wie *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus pyogenes* die Expression der Virulenzgene (Bai et al., 2013; Cho und Kang, 2013). GdpP ist über zwei Transmembranhelices in der Membran verankert. Im zytosolischen Teil folgt eine PAS (= Per-Arnt-Sim) Domäne, eine degenerierte GGDEF Domäne, eine DHH und eine DHHA1 Domäne. Die Per-Arnt-Sim Domäne ist nach den Proteinen benannt, in denen sie zunächst entdeckt wurde und bindet in Bakterien kleine Moleküle. Im Falle von *B. subtilis* sind es B-Typ Häme, welche die Aktivität der GGDEF und der DHH/DHHA1 Domänen inhibieren (Rao et al., 2011). Während die Funktion der GGDEF Domäne unbekannt ist, katalysieren die DHH bzw. DHHA1 (DHH = Aspartat-Histidin-Histidin = konserviertes Motiv in der aktiven Tasche) die Hydrolyse von c-di-AMP in 5'-pApA (=5'-Phosphoadenylyl-3'-5'-Adenosin). Neben der Inaktivierung durch B-Typ Häme, ist das Sekundärmetabolit und Alarmon (p)ppGpp ein Inhibitor der Phosphodiesterase Aktivität in *B. subtilis* (Rao et al., 2010).

Während in GdpP die DHH/DHHA1 Domäne die Hydrolyse von c-di-AMP katalysiert, ist es bei PgpH die HD Domäne. Diese ist auch nach dem konservierten HD (=Histidin-Aspartat) Motiv im aktiven Zentrum benannt (Huynh et al., 2015). Am N-Terminus des Proteins befindet sich eine Transmembranhelix, daran anschließend eine extrazelluläre 7-Transmembranhelix-HDED Domäne (7TMR-HDED), weitere 7 Transmembranhelices und die sich im Zytosol befindende HD Domäne. Es wird vermutet, dass die 7TMR-HDED Domäne als Sensor fungiert und extrazelluläre Signale an die HD Domäne im Inneren der Zelle weiterleitet (Anantharaman und Aravind, 2003). Interessanterweise wird auch PgpH durch (p)ppGpp inhibiert und c-di-AMP hat einen Einfluss auf das Level des Alarmons in *L. monocytogenes* (Liu et al., 2006). Im Allgemeinen ist PgpH die am weitesten verbreitete Phosphodiesterase in Bakterien, vor allem in den Firmicuten und scheint damit das Haupt-Enzym für die Hydrolyse von c-di-AMP zu sein (Huynh und Woodward, 2016a).

3.3.3 Kalium und Glutamat - Regulatoren der c-di-AMP Homöostase?

Kalium und Glutamat bilden sowohl in *B. subtilis* als auch in anderen Organismen den größten Pool an positiv bzw. negativ geladenen Ionen in der Zelle. Während Kalium für einen stabilen

Turgor und pH Wert sorgt, indem es die negativen Ladungen der DNA und von Aminosäuren puffert, dient Glutamat als universeller Aminogruppendonor und Vorläufer für andere Aminosäuren wie Prolin, Arginin und Glutamin (Epstein, 2003; Bennett et al., 2009). Wichtig für diese Arbeit ist zudem der Fakt, dass sowohl Kalium als auch Glutamat essenzielle Rollen in der Osmostressantwort in vielen Organismen spielen (siehe 3.6). Glutamat kann in manchen Organismen selbst als Osmoprotektivum dienen als auch in anderen Organismen wie *B. subtilis* Vorläufer für die Synthese von Prolin sein, welches dann als Osmoprotektivum wirkt (Csonka et al., 1994; Brill et al., 2011a).

Interessanterweise gibt es einige wichtige Befunde im Zusammenhang mit Kalium, Glutamat und c-di-AMP: (I) Das c-di-AMP Level in der Zelle ist abhängig von der Kalium Konzentration. Viel Kalium führt zu einem hohen c-di-AMP Level und wenig Kalium zu einem niedrigem c-di-AMP Level (Gundlach et al., 2017b; Pham et al., 2018; Zarrella et al., 2018). Umgekehrt kontrolliert c-di-AMP auch die Kaliumkonzentration durch die Regulation sowohl der Expression als auch der Aktivität der Kaliumimporter (Gundlach et al., 2017a; Gundlach et al., 2017b; Gundlach et al., 2019). (II) Wie bereits oben erwähnt, ist c-di-AMP unter Standardbedingungen essenziell, wird aber zum Beispiel in *B. subtilis* verzichtbar bei Wachstum mit niedrigen Kaliumkonzentrationen bis zu 0,1 mM. Mehr Kalium führt zur Bildung von Suppressormutanten, welche einen vermehrten Export von Kalium über den Transporter NhaK ermöglichen (Gundlach et al., 2017b). (III) Glutamat als Stickstoffquelle führt in *B. subtilis* zu höheren c-di-AMP Konzentrationen als zum Beispiel Ammonium oder Glutamin (Gundlach et al., 2015).

3.4 Osmotisch bedingter Stress in Mikroorganismen

Bereits im vorherigen Kapitel wurde die Rolle von Kalium für osmotisch bedingten Stress in *B. subtilis* und anderen Organismen erwähnt. Doch was genau bedeutet osmotisch bedingter Stress? Durch seinen Lebensraum in den oberen Schichten des Bodens ist *B. subtilis* sich ständig ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt. Neben Fluktuationen in pH Wert, Sauerstoff- und Nährstoffverfügbarkeit kann es zu Änderungen der Osmolarität der Umgebung kommen. Das führt dazu, dass das osmotische Potential in der Zelle angepasst werden muss. Allerdings können Mikroorganismen für die Anpassung nicht aktiv (= unter Verbrauch von Energie) Wasser in die oder aus der Zelle befördern (Booth et al., 2007; Bremer und Krämer, 2019). Deshalb gibt es verschiedene Anpassungen an plötzliche Veränderungen in der Osmolarität in der Umgebung: Zum einen kann es durch Überflutung des Bodens zu hypoosmotischen Stress in der Zelle kommen. Infolgedessen strömt Wasser ungehindert über die semipermeable Membran der Zelle ein, der Turgor (= Druck von innen auf die Zellwand) steigt und ein Platzen der Zelle droht (Wood, 1999; Typas et al., 2011). Um das zu verhindern, öffnen sich in der Zellmembran befindende mechanosensitive Kanäle, welche unselektiv Ionen und andere gelöste Stoffe in die Umgebung entlassen (Booth et al., 2007; Hoffmann et al., 2008; Booth und Blount, 2012; Bremer und Krämer, 2019).

Im Vergleich dazu sorgt vermehrte Sonneneinstrahlung und das Fehlen von Regen zu hyperosmotischem Stress in der Zelle. In dem Falle gibt es verschiedene Mechanismen, wie Organismen damit umgehen können: Die sogenannte *salt-in* und die *salt-out* Strategie. Erstere basiert darauf, dass der Organismus größere Mengen von anorganischen Ionen wie Kalium

und Chlorid in der Zelle akkumuliert (Oren, 2013; Gunde-Cimerman et al., 2018). Diese Strategie ist zwar energetisch gesehen günstiger als die *salt-out* Strategie, aber wird auch nur von Organismen angewendet, welche an eine Umgebung mit ständig hohem Salzgehalt angepasst sind (Oren, 2011; Oren, 2013).

3.5 Reaktion von *B. subtilis* bei hyperosmotischem Stress

Organismen wie zum Beispiel *B. subtilis*, welche nicht in einer im Allgemeinen hochosmolaren Umgebung leben, praktizieren die *salt-out* Strategie. Dabei wird auch in einem ersten Schritt eine hohe Menge Kalium in der Zelle akkumuliert (Dinnbier et al., 1988; Csonka, 1989; Whatmore und Reed, 1990; Kempf und Bremer, 1998). Dieses wird durch die Transporter KtrCD, KtrAB und KimA aufgenommen, wobei KtrCD eine geringe und KtrAB und KimA eine hohe Affinität für Kalium aufweisen (Holtmann et al., 2003; Gundlach et al., 2017b). Durch ihre positive Ladung stören Kaliumionen in der Menge den zellulären Stoffwechsel, wie zum Beispiel die Proteinbiosynthese (Yancey et al., 1982). Aus diesem Grund werden die Kaliumionen in einem zweiten Schritt wieder exportiert. Auch für den Export von Kalium gibt es in *B. subtilis* verschiedene Systeme: KhtT/U ist ein Zweikomponentensystem, welches als Kalium/Protonen Antiporter zur CPA-2 (cation/potassium antiporter-2) Familie gehört. Er besteht aus dem Membranprotein KhtU und dem assoziierten cytoplasmatischen Protein KhtT, wobei KhtT eine RCK (regulator of conductance of K⁺) Domäne aufweist und die Aktivität von KhtU reguliert (Fujisawa et al., 2007). Ein zweiter Kaliumexporter ist YugO, welcher ähnlich wie KhtT/U aus einem Membranprotein und einem cytoplasmatischen Teil mit RCK Domäne besetzt, welche allerdings fusioniert sind. Ein interner Translationsstart im *yugO* Gen führt zur Bildung einer zweiten RCK Domäne (Ye et al., 2010; Prindle et al., 2015).

Der Export von Kalium reduziert im Allgemeinen die Ionenstärke im Inneren der Zelle, ist aber nur möglich, da parallel der zweite Schritt der Osmostressantwort beginnt, die Akkumulation von sogenannten kompatiblen Soluten, welche in den folgenden Kapiteln näher beleuchtet wird.

3.5.1 Kompatible Solute

Kompatible Solute sind, wie der Name schon andeutet, Stoffe, die kompatibel mit dem bakteriellen Stoffwechsel sind. Grund dafür ist, dass sie bei physiologischem pH keine Nettoladung aufweisen und in der Zelle in großer Menge akkumuliert werden können ohne den bakteriellen Stoffwechsel zu stören (Brown und Simpson, 1972; Csonka, 1989; Yancey, 2005). Kompatible Solute sind relativ kleine, wasserlösliche Verbindungen, welche sich verschiedenen Klassen zuordnen lassen: Zucker, wie zum Beispiel Trehalose; Aminosäuren und Aminosäurederivate, wie zum Beispiel Glutamat, Prolin, und Ectoin; Polyole, wie zum Beispiel Glycerol und Trimethylammoniumverbindungen, wie zum Beispiel Glycinbetain, Carnitin und DMSP (Kempf und Bremer, 1998; Bremer, 2000; Yancey, 2005). Kompatible Solute werden auch als *Chemische Chaperone* bezeichnet (Knapp et al., 1999; Stadtmiller et al., 2017). Sie werden aus der Hydrathülle von Proteinen ausgeschlossen und unterstützen damit deren Faltung und Funktion. Dieser Effekt wird auch als *preferential exclusion* bezeichnet (Diamant et al., 2001; Street et al.,

2006). Kompatible Solute fungieren nicht nur als Osmoprotektiva, sondern können auch vor anderen Stressbedingungen wie zum Beispiel Hitze oder Kälte schützen (Holtmann und Bremer, 2004; Hoffmann und Bremer, 2011).

3.5.2 Synthese kompatibler Solute

In *B. subtilis* gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, kompatible Solute zu akkumulieren: Eine davon ist die (*de novo*) Synthese: Prolin ist eine Aminosäure, welche bei osmotisch bedingtem Stress aus dem Vorläufer Glutamat in Mengen bis zu 400 mM (bei 1 M NaCl) synthetisiert wird, sofern kein anderes kompatibles Solut extrazellulär zur Verfügung steht (Whatmore et al., 1990). Dabei kann die Zelle die Prolinsynthese sehr fein auf die extrazelluläre Osmolarität abstimmen (siehe Abb. 3, **B**) (Brill et al., 2011a; Hoffmann et al., 2013). Die osmoadaptive Prolinsynthese wird über die Enzyme ProJ, ProA und ProH bewerkstelligt (siehe Abb. 3, **A**). Die Gene *proH* und *proJ* sind in einem Operon kodiert, welches osmotisch induziert wird, sowohl bei kontinuierlichem Stress, als auch bei einem plötzlichen Salzschock. Die Tatsache, dass *B. subtilis* bei Deletion des *proHJ* Operons einen osmosensitiven Phänotyp im Wachstum zeigt, weist nach, dass die Prolinsynthese ein wesentlicher Bestandteil der Osmoadaption ist (Brill et al., 2011a; Hoffmann et al., 2017b).

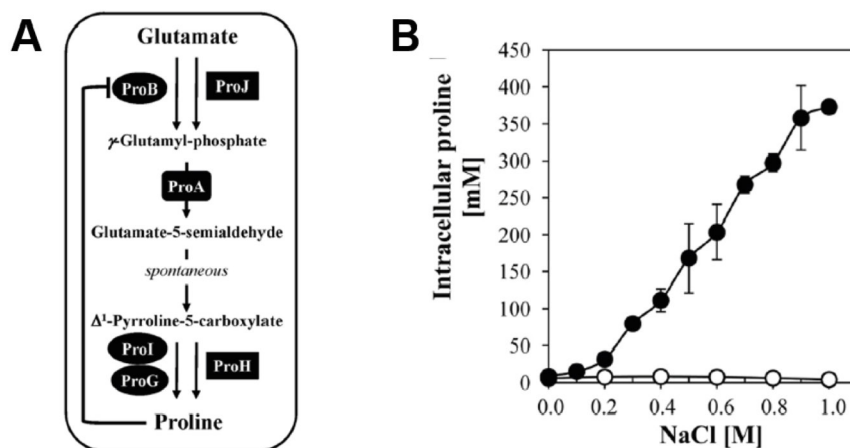


Abbildung 3: Prolinsynthese in *B. subtilis*. (A) Anabole und osmoadaptive Prolinsynthese aus dem Vorläufer Glutamat. Für die anabole Synthese werden die Enzyme ProB, ProA und ProI, bei der osmoadaptiven Synthese die Enzyme ProJ, ProA und ProH genutzt. Abbildung aus Brill et al., 2011a. (B) Prolinpool in Abhängigkeit von der NaCl Konzentration im Medium ohne (schwarze Kreise) und mit der Zugabe von 1 mM Glycinbetain (weiße Kreise). Abbildung aus Hoffmann et al., 2013.

Neben der osmoadaptiven Prolinsynthese gibt es auch eine für anabole Zwecke: Über die Enzyme ProB, ProA und ProI wird ebenfalls aus dem Vorläufer Glutamat Prolin synthetisiert. Die Regulation der Synthese erfolgt zum einen durch einen T-Box Mechanismus, zum anderen gibt es eine Feedback-Hemmung von ProB durch Prolin (siehe Abb. 3, **A**) (Brill et al., 2011b). Schaut man den osmoadaptiven und den anabolen Prolin-Syntheseweg an, fällt auf, dass es für die Reduktion von Gamma-Glutamyl-Phosphat zu Glutamat-5-Semialdehyd nur ein Enzym ProA für beide Wege gibt (Belitsky et al., 2001). ProA stellt damit die Verbindung zwischen beiden Wegen her und theoretisch sollte durch eine Deletion des *proA* Gens die Prolinsynthese nicht mehr möglich sein. Allerdings bilden Stämme mit einer Deletion von *proA* auf Minimalme-

diumplatten ohne Prolin Mikrokolonien, darüber hinaus vereinzelt Suppressor-Kolonien, welche phänotypisch ähnlich dem Wildtyp sind (Zaprasis et al., 2013). Für diese Suppressoren konnte zum einen gezeigt werden, dass diese zwar bei Wachstum in Minimalmedium einen ähnlichen Prolinpool wie ein Wildtypstamm aufbauen konnten (rund 10 mM, Whatmore et al., 1990; Hoffmann et al., 2013), hingegen die Akkumulation von großen Prolinkonzentrationen von bis zu 500 mM bei osmotischem Stress nicht möglich war. Ersteres konnte durch vermehrte Expression des Gens *rocD* gewährleistet werden (Zaprasis et al., 2013). Dessen kodiertes Enzym RocD ist ein Teil des Argininabbauwegs in *B. subtilis* und synthetisiert das gleiche Zwischenprodukt wie ProA (Gardan et al., 1995).

Das zweite kompatible Solut, was von *B. subtilis* synthetisiert werden kann, ist Glycinbetain. Es ist das am weitesten verbreitete kompatible Solut und wird sowohl von Bakterien, Eukaryoten als auch von Archäen als Osmoprotektivum genutzt (Yancey, 2005). Die Synthese geschieht allerdings nicht *de novo*, sondern aus Cholin, welches vorher von der Zelle aufgenommen werden muss (Kappes et al., 1999; Nau-Wagner et al., 2012). Über zwei Schritte wird Cholin zu Glycinbetain oxidiert. Verantwortlich hierfür sind die Alkoholdehydrogenase GbsB und die Aldehyddehydrogenase GbsA (Boch et al., 1996). Das *gbsAB* Operon, welches für die beiden Enzyme kodiert, wird vom MarR-Typ Regulator GbsR reprimiert, welcher in entgegengesetzter Richtung direkt vor dem Operon kodiert wird. GbsR agiert mittels *Road-Block* Mechanismus und verhindert durch die Bindung stromabwärts des Transkriptionsstarts von *gbsAB*, dass in Abwesenheit von Cholin die Gene für die Glycinbetainsynthese abgelesen werden können. Die RNA Polymerase kann aber dennoch binden (Nau-Wagner et al., 2012; Warmbold et al., 2020). Wird Cholin durch die Transporter OpuB bzw. OpuC aufgenommen (für Details zu den Transportern siehe 3.5.3), bindet es an GbsR, welches daraufhin seine Konformation ändert, sich von der DNA löst und damit die Transkription des *gbsAB* Operons freigibt. Das toxische Intermediat der Glycinbetainsynthese (Glycinbetinaldehyd) wirkt ebenfalls als Induktor des *gbsAB* Operons (Kappes et al., 1999; Nau-Wagner et al., 2012). Zusätzlich gibt es eine Feedback-Hemmung der Synthese durch das Reaktionsprodukt Glycinbetain, um eine Überakkumulation dieses kompatiblen Soluts zu verhindern (Nau-Wagner et al., 2012; Hoffmann et al., 2013). Interessanterweise wird auch die Expression des *opuB* Operons durch GbsR reguliert (Nau-Wagner et al., 2012), die Expression des *opuC* Operons hingegen nicht, obwohl beide resultierenden Transporter Cholin aufnehmen. Stattdessen gibt es zusätzlich den zu GbsR verwandten Mar-Typ Regulator OpcR, welcher sowohl die Expression des *opuB* Operons als auch die Expression des *opuC* Operons reguliert (Lee et al., 2013). Im Gegensatz zu GbsR agiert OpcR allerdings nicht mittels Road-Block Mechanismus, sondern verhindert die Bindung der RNA Polymerase an die -35 Region des *opuB* und des *opuC* Promotors (Lee et al., 2013; Warmbold et al., 2020). Dieses komplexe Netzwerk an Regulatoren und Mechanismen erlaubt es *B. subtilis*, die Synthese von Glycinbetain aus Cholin sehr fein auf den aktuellen osmotischen Stress und den aktuellen Pool des kompatiblen Soluts abzustimmen.

3.5.3 Aufnahme kompatibler Solute

Das kompatible Solut Glycinbetain kann nicht nur aus dem Vorläufer Cholin synthetisiert werden, sondern auch direkt aus der Umgebung aufgenommen werden. Im Allgemeinen werden kompatible Solute durch Mikroorganismen bei hypoosmotischen Bedingungen an die Umwelt abgegeben, entstehen beim Absterben von tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Zellen oder werden von Wurzeln an die Umwelt abgegeben (Welsh, 2000). *B. subtilis* besitzt verschiedene Systeme, die sogenannten Opu (**o**smostress **p**rotectant **u**ptake) Transporter um kompatible Solute aus der Umwelt aufzunehmen. Diese Transporter lassen sich verschiedenen Klassen zuordnen und besitzen ganz unterschiedliche Substratspektren (siehe Abb. 4) (Bremer, 2000; Hoffmann und Bremer, 2017a).

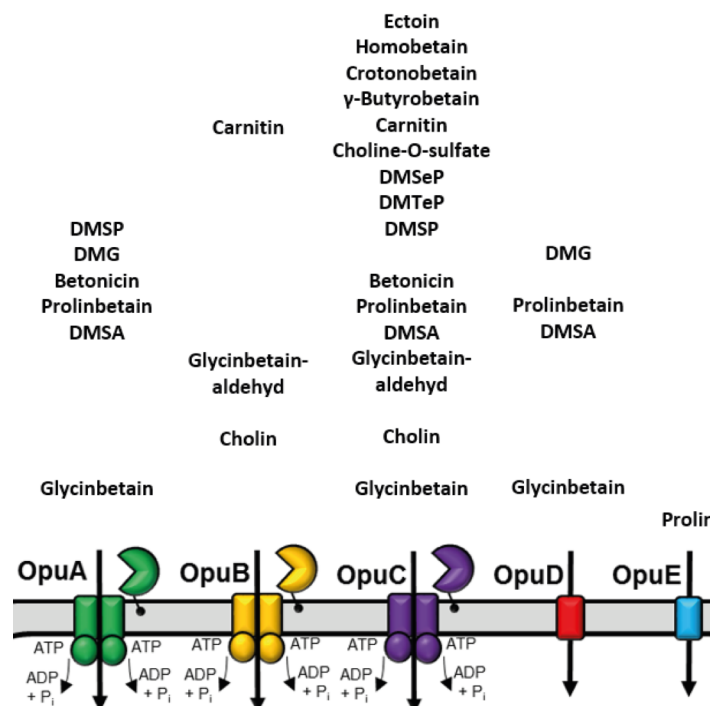


Abbildung 4: Substratspektrum der Opu Transporter aus *B. subtilis*. OpuA, OpuB und OpuC sind Substratbindepotein-abhängige ABC Transporter, OpuD ein BCCT Transporter und OpuE ein SSS Transporter (Bremer, 2000; Hoffmann und Bremer, 2017a).

Die Transporter OpuD und OpuE sind sekundäre Transporter und bestehen nur aus einer einzelnen Komponente. OpuD zählt zu den **B**etain-**C**holin-**C**arnitin-**T**ransportern (BCCT) und transportiert hauptsächlich Glycinbetain, daneben auch Dimethylglycin (DMG) und Dimethylsulfonioacetat (DMSA) und Prolinbetain (Kappes et al., 1996; Kappes et al., 1999). OpuE ist ein Transporter spezifisch für Prolin und gehört zu den **S**odium/**S**olute-**S**ymportern (SSS) (von Blohn et al., 1997). Wie der Name andeutet, werden beim Transport von Prolin auch Natriumionen mit aufgenommen. Gleiches gilt auch für OpuD (von Blohn et al., 1997).

Natrium ist in größeren Mengen allerdings giftig für die Zelle, weswegen dessen Konzentration meist niedrig gehalten wird (Górecki et al., 2014). Für den Natriumexport gibt es in *B. subtilis* verschiedene Systeme: Der ABC Transporter NatAB, welcher durch das Zweikomponentensystem NatKR kontrolliert wird, reguliert den Natriumhaushalt vor allem bei alkalinem

pH Wert (Ogura et al., 2007). Der Mehrkomponententransporter Mrp sowie die Einzelkomponententransporter NhaK und NhaC spielen beim Natriumexport während osmotisch bedingtem Stress eine Rolle (Hahne et al., 2010). Alle drei Transporter werden durch Salzstress transkriptionell induziert und eine Deletion des Mrp Systems führt zu einem osmosensitiven Phänotyp (Górecki et al., 2014).

Die Transporter OpuA, OpuB und OpuC gehören zu den Substratbindepotein-abhängigen **ATP-binding cassette** (ABC) Transportern und zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass der Transport von kompatiblen Soluten unter ATP Verbrauch geschieht (Kempf und Bremer, 1995; Davidson et al., 2008). OpuA nimmt sehr effizient Glycinbetain auf (Kempf und Bremer, 1995; Kappes et al., 1996), daneben aber auch Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP), DMG, Betonin, Prolinbetain und DMSA (Bashir et al., 2014a; Bashir et al., 2014b; Broy et al., 2015). Die Transporter OpuB und OpuC sind insofern besonders, als dass sie zwar nahe verwandt sind, aber sehr unterschiedliche Substratspektren aufweisen. Während OpuB ein spezifischer Transporter für Cholin und Glycinbetainaldehyd ist (niederaffin wird auch Carnitin aufgenommen; Teichmann et al., 2017), transportiert OpuC mit Ausnahme von Prolin und DMG alle bisher bekannten kompatiblen Solute für *B. subtilis* (Boch et al., 1996; von Blohn et al., 1997; Nau-Wagner et al., 2012; Bashir et al., 2014b). Die hohen Sequenzidentitäten der einzelnen Komponenten von OpuB und OpuC weisen auf eine nahe Verwandtschaft hin: Substratbindepoteine OpuBC und OpuCC 71 %, Transmembrandomänen OpuBB/CB und OpuBD/OpuCD 85 % und Nukleotidbindedomänen OpuBA und OpuCA 84 % (Kappes et al., 1999). Auf dem Chromosomen von *B. subtilis* liegen das *opuB* Operon und das *opuC* Operon sehr nah beieinander, was darauf hinweist, dass die beiden Transporter aus einer Genduplikation entstanden sein könnten (Kappes et al., 1999). Aus einer Analyse von OpuB und OpuC Transportern im Genus *Bacillus* geht hervor, dass OpuC bereits in *Bacillus* Stämmen vorkommt, welche evolutionär älter sind. Daher wird davon ausgegangen, dass der OpuB Transporter aus dem OpuC Transporter entstanden ist (Teichmann et al., 2018).

Interessanterweise wurde kürzlich bei BLAST Analysen mit den SBPs von OpuB und OpuC im Genus *Bacillus* ein neuartiger Transporter der Opu Familie entdeckt. In diesem Transporter, welcher OpuF benannt wurde, ist besonders, dass er nur aus zwei statt vier Komponenten besteht. Das SBP ist mit der TMD fusioniert, zusätzlich gibt es die für ABC Transporter typische NBD (Teichmann et al., 2018). Insgesamt besteht der funktionelle Transporter aus dem NBD Dimer und zwei Kopien der TMD-SBP Fusion. Eine 16S rRNA Analyse zeigte außerdem, dass OpuF im Genus *Bacillus* sehr weit verbreitet ist, allerdings fehlt er in *B. subtilis* (Teichmann et al., 2018).

3.5.4 Struktur und Mechanismus der ABC-Transporter OpuA, OpuB und OpuC

Wie bereits oben erwähnt, gehören OpuA, OpuB und OpuC zur Familie der Substratbindepotein-abhängigen ABC Transportern. ABC Transporter lassen sich zunächst generell in Importer und Exporter unterteilen, wobei man ABC Importer nur in Prokaryoten findet. Dabei haben alle gemeinsam, dass sie aus jeweils zwei Transmembrandomänen (TMD) und zwei Nukleotidbindedomänen (NBD) bestehen (Higgins, 1992; Biemans-Oldehinkel et al., 2006b). Bei bakteriellen ABC Importern sind alle Domänen in einzelnen Proteinen kodiert, wohingegen bei ABC Export-

tern eine TMD mit einer NBD fusioniert ist, welches dann mit einer zweiten TMD-NBD-Fusion ein Homo- oder ein Heterodimer bildet. In vielen eukaryotischen ABC Transportern sind alle vier Domänen meist in einer einzigen Peptidkette kodiert (Hollenstein et al., 2007).

Bei den ABC Importern unterscheidet man zwischen Typ 1, Typ 2 und ECF Typ (energy coupling factor) Importern. Typ1 und 2 ABC Importer besitzen neben zwei TMDs und zwei NBDs noch ein extrazellulär liegendes Substratbindeprotein (SBP) (siehe Abb. 5) (Locher, 2016).

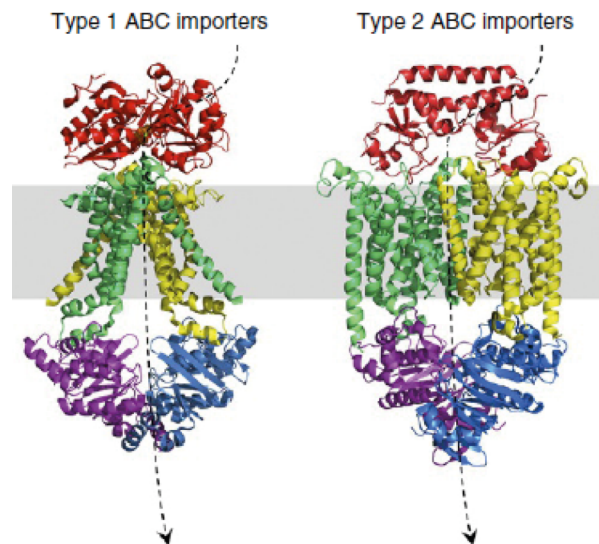


Abbildung 5: Struktur von Typ 1 und Typ 2 ABC Importern. Typ 1 Importer: Molybdat/Wolframat Transporter ModBC-A aus *Archaeoglobus fulgidus*. **Typ 2 Importer:** Vitamin B12 Transporter BtuCD-F aus *E. coli*. Substratbindeproteine sind jeweils in rot, die beiden Transmembrandomänen in grün bzw. gelb und die beiden Nukleotidbindedomänen in violett bzw. blau gekennzeichnet. Abbildung aus Locher, 2016.

Typ 1 ABC Importer transportieren typischerweise größere Mengen Nährstoffe wie Zucker und Aminosäuren mit einer moderaten Affinität. Der am besten charakterisierte ABC Transporter dieses Typs ist der Maltose Importer aus *E. coli* (Shilton, 2008; Chen, 2013; Alvarez et al., 2015). Die Besonderheit des Maltose Importers ist, dass es eine zusätzliche Substratbindestelle an den TMDs gibt (Oldham et al., 2007). Typ 2 ABC Importer können Substrate in sehr geringen Konzentrationen wahrnehmen, mit hoher Affinität binden und transportieren. Das sind zum Beispiel Häme, Cobalamin oder Vitamine. Auch hier ist ein Importer aus *E. coli* das am besten untersuchte System, der Vitamin B12 Importer BtuCD-BtuF (siehe Abb. 5). Im Gegensatz zu Typ 1 Transporter erfolgt bei Typ 2 keine Konformationsänderung der TMDs für die Translokation des Substrats ins Zytoplasma. Stattdessen gibt es drei „Tore“ an den TMDs, eins in Richtung Periplasma und zwei in Richtung Zytoplasma, welche sich während der Translokation öffnen und schließen können (Hvorup et al., 2007; Joseph et al., 2011; Korkhov et al., 2014). Das SBP von ABC Transportern legt das Substratspektrum sowie die Affinität des Transporters für die Substrate fest (Berntsson et al., 2010). Während das SBP bei Gram-negativen Bakterien frei im Periplasma diffundiert, ist es bei Gram-positiven Bakterien wie *B. subtilis* über einen Lipidanker in der Zellmembran verankert (Kempf und Bremer, 1995; Kappes et al., 1999; van der Heide und Poolman, 2002) und bei Archaeen manchmal über eine hydrophobe Helix mit der Membran verbunden (Hollenstein et al., 2007).

Allgemein stellt sich die Frage, wie das SBP sein Substrat binden kann, wenn wie weiter oben beschrieben kompatible Solute von der Hydrathülle von Proteinen ausgeschlossen werden (Street et al., 2006). Die Frage konnte durch die Analyse von ProX, dem SBP des Transporters von ProU aus *E. coli* beantwortet werden (Schiefner et al., 2003): In der Bindetasche des SBPs befindet sich ein sogenannter *aromatischer Käfig* aus drei Tryptophanresten. Diese interagieren mit den positiv geladenen Trimethylammoniumgruppen des Liganden Glycinbetain über Kation- π -Interaktionen. Der Carboxy-Terminus von Glycinbetain ragt aus dem aromatischen Käfig heraus und wird über andere Reste stabilisiert (Schiefner et al., 2003). Dieses Muster konnte auch für die drei SBPs der Opu Transporter aus *B. subtilis* gezeigt werden (Horn et al., 2006; Du et al., 2011; Pittelkow et al., 2011). Des Weiteren zeigte sich beim SBP von OpuC (OpuCC), dass die Bindestelle für die Substrate relativ flexibel ist und somit ermöglicht, dass das breite Spektrum an Substraten aufgenommen werden kann (Du et al., 2011).

Charakteristisch für SBP ist, dass diese aus zwei Domänen bestehen, welche über flexible Linker verbunden sind. Im Interface zwischen den beiden Domänen befindet sich die Bindetasche für das Substrat (Berntsson et al., 2010; Scheepers et al., 2016). Wird ein Substrat gebunden, wird das Substrat zwischen den beiden Domänen eingeschlossen, woraufhin die Interaktion mit den TMDs folgt (Grote et al., 2009; Hollenstein et al., 2007; Alvarez et al., 2015). Diese Interaktion führt im Anschluss daran dazu, dass sich die Konformation von TMDs und NBDs so ändert, dass letztere ATP binden können (siehe Abb. 6, (1)). Durch das gebundene ATP öffnet sich ein Kanal zwischen den NBDs, in den das Substrat vom SBP transportiert wird (siehe Abb. 6, (2)) (Oldham et al., 2007; Shilton, 2008; Eitingner et al., 2011; Locher, 2016). Die Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat führt im Anschluss daran dazu, dass sich die TMDs zum Inneren der Zelle öffnen und das Substrat ins Zytoplasma entlassen werden kann (siehe Abb. 6, (3)) (Patzlaff et al., 2003; Oswald et al., 2006; Davidson et al., 2008; Orelle et al., 2010).

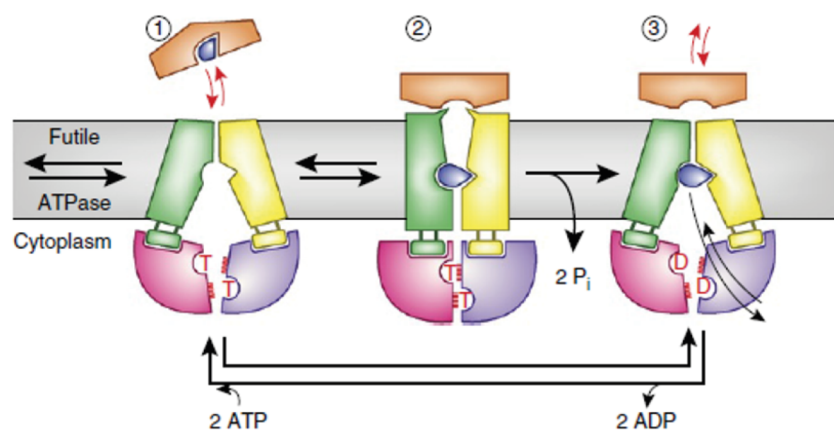


Abbildung 6: Mechanismus eines Typ 1 ABC Importers. SBP = orange; TMD = grün bzw. gelb; NBD = pink bzw. violett. (1) Das Substrat bindet an das SBP und jeweils ein Molekül ATP an eine NBD. (2) Das Andocken des SBPs an die TMDs führt zu einer Konformationsänderung von TMD und NBD. NBD bereit für ATP Hydrolyse. (3) ATP Hydrolyse zu ADP und Phosphat führt zur Entlassung des Substrats ins Zytoplasma. Abbildung aus Locher, 2016.

Anhand des ABC Transporters OpuA aus *L. lactis* konnte gezeigt werden, dass für den Transport eines Moleküls Glycinbetain zwei Moleküle ATP verbraucht werden (Patzlaff et al., 2003). Die Hydrolyse eines Moleküls ATP bei ABC Transportern in Zellen liefert dabei 50 kJ / Mol Energie (ter Beek et al., 2014).

3.5.5 Die Besonderheit der Nukleotidbindedomänen von OpuA, OpuB und OpuC

Während das Substratbindedomäne von ABC Transportern das Substratspektrum und die Affinität des Transporters determiniert, sind die Nukleotidbindedomänen der Teil, der den Transporter zum ABC Transporter macht. Diese Domänen sind hoch konserviert und liefern durch die Hydrolyse von ATP die Energie für den Transport (Davidson und Chen, 2004; Davidson et al., 2008). Insgesamt besteht eine NBD aus einer helikalen und einer katalytisch aktiven RecA-artigen Domäne. Letztere wurde so benannt, da sie strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Protein RecA hat (Story und Steitz, 1992). Charakteristisch in der NBD sind die Motive, an denen das ATP bindet, die Motive Walker A und Walker B. Genauer genommen binden Walker A und Walker B die Phosphate von ATP bzw. ADP und koordinieren ein Magnesiumion (Walker et al., 1982). Die beiden NBDs dimerisieren durch die Interaktion des konservierten LSGGQ-Motivs des einen Monomers mit dem Gamma-Phosphat des ATPs, welches im anderen Monomer gebunden ist (Davidson und Chen, 2004).

Eine Studie zur NBD von OpuA aus *L. lactis* zeigte, dass diese nicht nur aus der ATPase besteht, sondern der C-terminus noch wesentlich länger ist, was an sich eher unüblich ist für NBDs von ABC Transportern (Biemans-Oldehinkel et al., 2006a; Biemans-Oldehinkel et al., 2006b). Bei dieser „Verlängerung“ der NBD handelt es sich um zwei sogenannte CBS Domänen. CBS kommt von **C**ystathionin-**B**eta-**S**ynthase, dem Enzym, welches die Kondensierung von Homocystein und Serin katalysiert. Die regulatorische Domäne dieses Proteins wird als CBS Domäne bezeichnet (Miles und Kraus, 2004). Jede NBD hat am C-Terminus die Domänen CBS1 und CBS2, woraus sich für ein funktionelles NBD Dimer insgesamt vier CBS Domänen ergeben. Insgesamt wurden bisher in über 4000 Proteinen CBS Domänen als regulatorische Untereinheiten identifiziert und einige schon charakterisiert. Allerdings sind diese in ihrer Sequenz nicht sehr hoch konserviert (im Gegensatz zur ATPase Domäne). In den Studien zu den CBS Domänen von *L. lactis* OpuA konnte gezeigt werden, dass diese als Sensor der Ionenstärke im Zytoplasma dienen. Des Weiteren scheint CBS1 nur als Linker zu fungieren, während die Interaktionen zwischen den beiden CBS2 Domänen Änderungen in der Ionenstärke an die ATPase Domäne weiterleitet (Biemans-Oldehinkel et al., 2006a; Biemans-Oldehinkel et al., 2006b; Karasawa et al., 2011; Karasawa et al., 2013).

Analog zu *L. lactis* OpuA weisen auch die drei NBD von OpuA, OpuB und OpuC aus *B. subtilis* CBS Domänen am C-Terminus auf (siehe Abb. 7). Allerdings ist noch nicht bekannt, welche (regulatorische) Funktion diese bei der Aufnahme von kompatiblen Soluten in *B. subtilis* übernehmen.

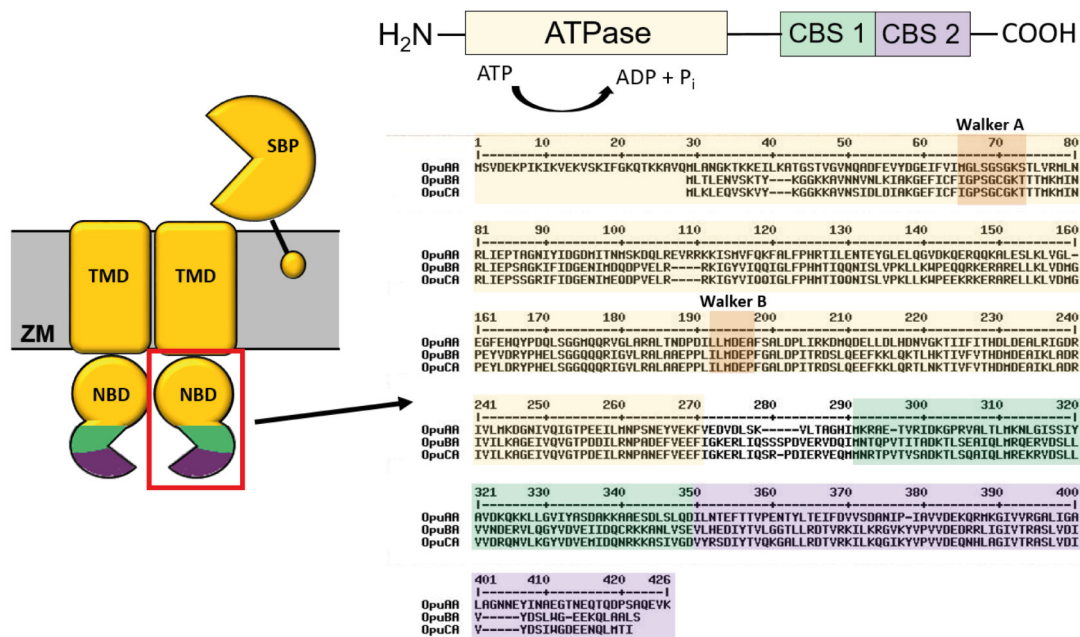


Abbildung 7: Besonderheit der Nukleotidbindedomänen der *B. subtilis* Opu Transporter. Dargestellt ist ein Schema sowie die Sequenz der NBD von OpuA, OpuB und OpuC. ATPase Domäne (gelb) mit den ATP bzw. ADP bindenden Walker A und Walker B Motiven (orange), sowie die C-terminalen CBS Domänen CBS1 (grün) und CBS2 (violett). ZM = Zyttoplasmamembran.

In anderen homologen Opu Transportern gab es bisher verschiedene Resultate und Hypothesen für die Rolle von CBS Domänen bei osmotisch bedingtem Stress: (I) Für OpuC aus dem Pflanzenpathogen *Pseudomonas syringae* wurde gezeigt, dass der Transporter ohne CBS Domänen nicht mehr funktionell ist. Der betreffende Stamm lies sich bei Salzstress nicht mehr mit Cholin oder Glycinbetain protektieren. Um diesen Effekt zu erzielen, reichte es schon aus, CBS2 zu deletieren (Chen und Beattie, 2007). (II) Für OpuC aus *L. monocytogenes* und *S. aureus* konnte interessanterweise gezeigt werden, dass die CBS Domänen den Second Messenger c-di-AMP binden (Huynh et al., 2016b; Schuster et al., 2016). Die Hypothese ist, dass die Bindung von c-di-AMP den Transporter abschaltet. Um diese Hypothese zu bestätigen und um festzustellen, welche Aminosäuren für die Bindung an c-di-AMP essenziell sind, wurden mit den OpuCA CBS Domänen aus *L. monocytogenes* *in vitro* Bindestudien durchgeführt. Es gab einige interessante Mutanten, die kein c-di-AMP mehr binden konnten. Allerdings zeigten sich für die Transporter Aktivität *in vivo* unterschiedliche Resultate für noch c-di-AMP bindende und nicht mehr bindende Mutanten. Somit konnte am Ende die oben genannte Hypothese nicht eindeutig bestätigt werden. Allerdings war ein Stamm, in dem durch Deletion der Phosphodiesterasen c-di-AMP akkumuliert wurde, sensitiv gegenüber osmotisch bedingtem Stress (Huynh et al., 2016b).

3.6 Die Rolle von c-di-AMP bei osmotisch bedingtem Stress in Bakterien

Durch das Ergebnis, dass c-di-AMP an die NBD von Opu Transportern bindet, liegt die Vermutung nahe, dass c-di-AMP generell in die Osmoadaption in Bakterien involviert ist. Darüber hinaus gibt es noch andere Interaktionspartner von c-di-AMP, die sowohl in *B. subtilis* als auch in anderen Bakterien mit der Adaption an osmotisch bedingten Stress zu tun haben.

In *B. subtilis* sorgt die schnelle Aufnahme von Kalium als erste Reaktion dafür, dass die Zellen nicht dehydrieren (siehe 3.5). Die Kaliumaufnahme wird zum einen auf transkriptioneller Ebene durch c-di-AMP reguliert. Sowohl das *ktrAB* Operon als auch *kimA*, welche für die beiden hoch affinen Kaliumimporteure aus *B. subtilis* kodieren, werden durch den *ydaO* Riboswitch reguliert. *ydaO* ist ein sogenannter *Off-Switch*, an den c-di-AMP bindet (Nelson et al., 2013). Ist *B. subtilis* einer hyperosmotischen Umgebung ausgesetzt, sorgt ein niedriges c-di-AMP Level dafür, dass sowohl *ktrAB* als auch *kimA* abgelesen werden können. Durch die Kaliumaufnahme erhöht sich die Kaliumkonzentration in der Zelle. Das führt zu einer erhöhten Produktion von c-di-AMP. Durch Bindung von c-di-AMP an den *ydaO* Riboswitch wird die Expression von *ktrAB* und *kimA* abgeschaltet. Für den *ydaO* Riboswitch aus *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* und *Thermovirga lienii* konnte bereits eine Kristallstruktur ermittelt werden sowie dessen Affinität zu c-di-AMP, welche im niederen nanomolaren Bereich liegt (Gao und Serganov, 2014). c-di-AMP reguliert an dieser Stelle aber auch direkt die Aktivität von KimA und KtrAB durch die Bindung an die Transporter (Holtmann et al., 2003; Gundlach et al., 2017a; Gundlach et al., 2017b; Gundlach et al., 2019). Neben KimA und KtrAB gibt es in *B. subtilis* noch einen dritten Kaliumimporteure, KtrCD, allerdings mit niedrigerer Affinität zu Kalium (Holtmann et al., 2003; Rocha et al., 2019). Dieser wird nur in seiner Aktivität durch c-di-AMP reguliert, nicht auf transkriptioneller Ebene. Bei KtrAB und KtrCD bindet c-di-AMP jeweils an eine RCK (regulator of conductance of K⁺) Domäne. RCK Domänen sind im Allgemeinen regulatorische Untereinheiten von Kaliumtransportern. Sie spielen unter anderem eine Rolle in der Regulation von pH Wert, Turgordruck und Membranpotential (Whatmore und Reed, 1990; Giraldez und Rothberg, 2017; Schrecker et al., 2019). Für die beiden Transporter KtrAB und KtrCD konnte bereits die Affinität zu c-di-AMP bestimmt werden: Interessanterweise liegt diese für die RCK Domäne des hoch affinen K⁺ Transporters KtrAB bei 3 μ M, hingegen für die RCK Domäne des niederaffinen K⁺ Transporters KtrCD bei 3 μ M (Rocha et al., 2019). Die Kristallstruktur von KimA konnte auch kürzlich aufgeklärt werden (Tascón et al., 2020) und mittels DRaCALA Assay konnte ebenfalls eine Bindung von c-di-AMP an KimA detektiert werden (Gundlach et al., 2019).

In anderen Bakterien gibt es noch andere Kaliumtransporter, welche von c-di-AMP reguliert werden. Ein Beispiel ist der ATP abhängige KdpFABC Transporter. Dieser wird normalerweise vom Zweikomponentensystem KdpDE reguliert (Ballal et al., 2007). Durch Bindung von c-di-AMP an KdpD wird die Expression des *kdpFABC* Operons verhindert (Moscoso et al., 2015; Gibhardt et al., 2019). Für KdpD aus *S. aureus* konnte eine Affinität der Bindung von c-di-AMP von 2 μ M gemessen werden (Moscoso et al., 2015). Interessanterweise besitzt auch *Bacillus thuringiensis* einen KdpFABC Transporter, allerdings fehlt da das Zweikomponentensystem KdpDE. Stattdessen gibt es ähnlich wie bei *ktrAB* und *kimA* einen *ydaO* Riboswitch vor dem *kdpFABC* Operon (Wang et al., 2019).

Neben den Kaliumimportern werden auch Kaliumexporter durch c-di-AMP reguliert um die Zelle vor toxischen Kaliumkonzentrationen zu schützen. Im Gegensatz zu den Importern erfolgt bei den Exportern eine Aktivierung durch c-di-AMP. Eine Bindung von c-di-AMP konnte sowohl für den Kalium/Protonen Antiporter CpaA aus *S. aureus* (Chin et al., 2015) als auch für dessen Homolog in *B. subtilis* gezeigt werden (Gundlach et al., 2019). Des Weiteren wurde die Bindung von c-di-AMP an KhtT, die Untereinheit des KhtT/U Exporters aus *B. subtilis* gezeigt (Gundlach et al., 2019).

Als zweiter Schritt in der Adaption an hyperosmotischen Stress erfolgt das Ersetzen von Kalium durch kompatible Solute (siehe 3.5.1). Auch hier gibt es bereits einige Erkenntnisse in Bezug auf die Regulation durch c-di-AMP. Für *L. lactis* und *Streptococcus agalactiae* konnte gezeigt werden, dass Stämme, welche durch Deletion der einzigen Phosphodiesterase c-di-AMP in den Zellen akkumulieren, sensitiv gegenüber hyperosmotischem Stress sind. Es entstanden Suppressormutanten, die die Aufnahme von kompatiblen Soluten ermöglichten durch Deaktivierung des Repressors BusR. Beide Spezies besitzen das *busAB* Operon (**b**etaine **u**ptake **s**ystem), welches für einen Glycinbetain-Importer kodiert. Ohne osmotischen Stress wird dieses Operon vom Repressor BusR reprimiert (Obis et al., 1999; Romeo et al., 2003). Bindung von c-di-AMP an den Repressor führt zu einer Co-Repression. Durch die Überakkumulation von c-di-AMP wurde somit die Expression von *busAB* dauerhaft verhindert und Suppressoren in BusR ermöglichten in diesem Stamm die Aufnahme von Glycinbetain (Devaux et al., 2018; Pham et al., 2018). Umgekehrt sorgt in manchen Spezies das Fehlen von c-di-AMP dafür, dass kompatible Solute in den Zellen akkumuliert werden. Auch hier entstehen in den jeweiligen c-di-AMP freien Stämmen Suppressoren, welche die Aufnahme von kompatiblen Soluten verhindern, so zum Beispiel GbuABC in *L. monocytogenes* und OpuD in *S. aureus* (Whiteley et al., 2017; Zeden et al., 2018).

Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben (siehe 3.5.5), bindet c-di-AMP auch an die CBS Domänen der OpuC Transporter aus *L. monocytogenes* und *S. aureus*. Allerdings ist durch *in vitro* Bindestudien und *in vivo* Transportassays nicht eindeutig klar geworden, welche Rolle c-di-AMP bei der Aufnahme kompatibler Solute durch OpuC spielt (Huynh et al., 2016b; Schuster et al., 2016). Auch für *B. subtilis* wurde kürzlich nach Interaktionspartnern von c-di-AMP gesucht, allerdings nur mit in *E. coli* heterolog exprimierten aber nicht gereinigten Proteinen. Dabei wurde gefunden, dass c-di-AMP an den ABC Transporter OpuC, aber nicht an OpuB bindet. Der dritte ABC Opu Transporter OpuA wurde dabei nicht getestet (Gundlach et al., 2019). Insgesamt scheint c-di-AMP ähnlich wie für die Kaliumhomöostase auch für die Regulation der Aufnahme kompatibler Solute eine Rolle zu spielen. Allerdings ist sowohl in *B. subtilis* als auch in anderen Organismen nicht ganz klar, welche Rolle c-di-AMP bei der Regulation von Opu Transportern spielt.

3.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln angedeutet, sind die Mechanismen und die Regulation der Antwort von *B. subtilis* aus osmotisch bedingten Stress schon sehr gut aufgeklärt worden. Eine zentrale Rolle spielen dabei sowohl die Kaliumhomöostase als auch die Akkumulation von kompatiblen Soluten. Letztere kann *B. subtilis* sehr fein auf die Osmolarität in der Umgebung abstimmen und besitzt dafür mehrere komplexe Regulationsmechanismen. Dass der Second Messenger c-di-AMP in die Regulation dieser Stressantwort eingreift, konnte schon in einigen Organismen gezeigt werden. Das betrifft sowohl die Kaliumhomöostase als auch die Aufnahme von kompatiblen Soluten. Allerdings ist bisher unklar, inwiefern c-di-AMP die Transporter OpuA, OpuB und OpuC in *B. subtilis* reguliert und damit die Aufnahme von kompatiblen Soluten beeinflusst.

Aus diesem Grund soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, welche Rolle c-di-AMP für die Transporter OpuA, OpuB und OpuC spielt. Dabei geht es zunächst um die allgemeine Frage, ob c-di-AMP *in vitro* an die drei CBS Domänen bindet. Da in *L. monocytogenes* und *S. aureus* noch nicht zu 100 % festgestellt werden konnte, ob die Bindung von c-di-AMP an die CBS Domänen die Transporter wirklich abschaltet, soll in einem weiteren Teil die Funktion von c-di-AMP *in vivo* bestimmt werden. Für eine Einordnung von c-di-AMP in die Physiologie von *B. subtilis* soll außerdem die Konzentration des Second Messengers in Abhängigkeit von der Osmolarität der Umgebung bestimmt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

4.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Hierbei wurde TOP10 für Klonierungen, Mutagenese und Plasmidpräparationen verwendet. *E. coli* BL21 bzw. Arctic wurden zur heterologen Expression von Proteinen genutzt.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme.

| <i>E. coli</i> Stamm | Genotyp | Referenz |
|-------------------------|--|---|
| TOP 10 | <i>F</i> -λ- <i>E44</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> ϕ80Δ(<i>lacZ</i>) Δ(<i>M15</i>) <i>hsdR17</i> (<i>r</i> <i>K</i> ⁻ <i>m</i> <i>K</i> ⁺) <i>recA1</i> <i>endA</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> <i>gyrA96</i> | Invitrogen GmbH (Karlsruhe, DE) |
| BL21(DE3) | <i>F</i> ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>rB</i> ⁻ <i>mB</i> ⁻) <i>dcm</i> ⁺ <i>Tet</i> ^r <i>gal</i> <i>endA</i> | Agilent Technologies (Santa Clara, USA) |
| ArcticExpress (DE3) RIL | <i>E. coli</i> <i>B</i> <i>F</i> ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>rB</i> ⁻ <i>mB</i> ⁻) <i>dcm</i> ⁺ <i>Tet</i> ^r <i>gal</i> λ(<i>DE3</i>) <i>endA</i> <i>Hte</i> [<i>cpn10</i> <i>cpn60</i> <i>Gent</i> ^r] | Agilent Technologies (Santa Clara, USA) |

Die verwendeten *B. subtilis* Stämme sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgelistet. Es wurden sowohl der Wildtyp Stamm 168 als auch der Wildtyp Stamm JH642 verwendet. Für alle Derivate, die in dieser Arbeit oder in vorausgegangenen Arbeiten konstruiert wurden, diente *B. subtilis* JH642 als Ausgangsstamm.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete *B. subtilis* Stämme aus der Stammsammlung AG Bremer.

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|----------|--|------------------------|
| JH642 | <i>trpC2</i> <i>pheA1</i> | Smith et al., 2014 |
| 168 | <i>trpC2</i> | BGSC Stamm 1A1 |
| JSB8 | Δ(<i>proHJ::tet</i>)1 | Brill et al., 2011a |
| TMB108 | Δ(<i>opuC::spc</i>)3 | Teichmann et al., 2017 |
| TMB116 | Δ(<i>opuB::ery</i>)3 | Teichmann et al., 2017 |
| TMB122 | Δ(<i>opuC::spc</i>)3 Δ(<i>opuB::ery</i>)3 | T. Hoffmann |
| BKK01750 | Δ(<i>cdaA::kan</i>) | Koo et al., 2017 |
| BKK00880 | Δ(<i>disA::kan</i>) | Koo et al., 2017 |
| BKK19430 | Δ(<i>cdaS::kan</i>) | Koo et al., 2017 |
| BSPC13 | Δ(<i>lacA::Pspac-cre spc lacI</i>) | Yan et al., 2008 |
| SBB1 | Δ(<i>opuC::spc</i>)3 Δ(<i>opuD::kan</i>)2 Δ(<i>opuB::ery</i>)1 | S. Broy |
| SBB2 | Δ(<i>opuA::tet</i>)3 Δ(<i>opuD::kan</i>)2 Δ(<i>opuB::ery</i>)1 | Teichmann et al., 2017 |
| SBB3 | Δ(<i>opuA::tet</i>)3 Δ(<i>opuB::ery</i>)1 Δ(<i>opuC::spc</i>)3 | S. Broy |
| SBB5 | Δ(<i>opuA::tet</i>)3 Δ(<i>opuC::spc</i>)3 Δ(<i>opuD::kan</i>)2 | Teichmann et al., 2017 |

Tabelle 3: In dieser Arbeit konstruierte *B. subtilis* Stämme. Plasmide (p...) wurden vor der Transformation linearisiert, gDNA bedeutet eine Transformation mittels genomischer DNA.

| Stamm | Genotyp | Konstruktion |
|-------|--|-----------------------|
| HDB13 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3$ $\text{amyE}::\text{opuB}::\text{cml}$ | TMB122 + pMT9 |
| HDB14 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3$ $\text{amyE}::\text{opuC}::\text{cml}$ | TMB122 + pChen3 |
| HDB15 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \text{amyE}::\text{opuB}-$ $\text{V}^{261}\text{A}::\text{cml}$ | TMB122 + pHD36 |
| HDB16 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \text{amyE}::\text{opuB}-$ $\text{S}^{283}\text{A}::\text{cml}$ | TMB122 + pHD37 |
| HDB17 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \text{amyE}::\text{opuB}-$ $\text{Y}^{343}\text{F}::\text{cml}$ | TMB122 + pHD39 |
| HDB18 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \text{amyE}::\text{opuB}-$ $\text{Y}^{343}\text{W}::\text{cml}$ | TMB122 + pHD43 |
| HDB19 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \text{amyE}::\text{opuB}-$ $\text{Y}^{343}\text{A}::\text{cml}$ | TMB122 + pHD38 |
| HDB20 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \text{amyE}::\text{opuB}-$ $\text{R}^{359}\text{A}::\text{cml}$ | TMB122 + pHD40 |
| HDB21 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \text{amyE}::\text{opuB}-$ $\text{V}^{261}\text{E}::\text{cml}$ | TMB122 + pHD42 |
| HDB22 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \text{amyE}::\text{opuB}-$ $\text{D}^{364}\text{K}::\text{cml}$ | TMB122 + pTP23 |
| HDB23 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \text{amyE}::\text{opuB}-$ $\text{K}^{342}\text{E}::\text{cml}$ | TMB122 + pTP24 |
| HDB25 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3 \text{amyE}::\text{opuB}-$ $\text{KY}^{341/342}\text{P}::\text{cml}$ | TMB122 + pTP26 |
| HDB41 | $\Delta(\text{cdaA}::\text{kan})$ | JH642 + gDNA BKK01750 |
| HDB45 | $\Delta(\text{disA}::\text{kan})$ | JH642 + gDNA BKK00880 |
| HDB47 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3$ $\text{amyE}::\text{opuB}\Delta\text{CBS}::\text{cml}$ | TMB122 + pHD53 |
| HDB48 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})3$ $\text{amyE}::\text{opuC}\Delta\text{CBS}::\text{cml}$ | TMB122 + pHD54 |
| HDB64 | $\Delta(\text{cdaS}::\text{kan})$ | JH642 + gDNA BKK19430 |
| HDB68 | $\Delta(\text{cdaA}) \Delta(\text{lacA}::\text{Pspac-cre spc lacI})$ | HDB41 + gDNA BSPPC13 |
| HDB69 | $\Delta(\text{disA}) \Delta(\text{lacA}::\text{Pspac-cre spc lacI})$ | HDB45 + gDNA BSPPC13 |
| HDB70 | $\Delta(\text{cdaS}) \Delta(\text{lacA}::\text{Pspac-cre spc lacI})$ | HDB64 + gDNA BSPPC13 |
| HDB71 | $\Delta(\text{cdaS}) \Delta(\text{disA}) \Delta(\text{lacA}::\text{Pspac-cre spc lacI})$ | HDB70 + gDNA HDB45 |
| HDB72 | $\Delta(\text{cdaS}) \Delta(\text{cdaA}) \Delta(\text{lacA}::\text{Pspac-cre spc lacI})$ | HDB70 + gDNA HDB41 |
| HDB84 | $\Delta(\text{proHJ}::\text{zeo})$ | JH542 + pHD63 |
| HDB85 | $\Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1$ $\Delta(\text{proHJ}::\text{zeo})$ | SBB1 + pHD63 |
| HDB86 | $\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2$ $\Delta(\text{proHJ}::\text{zeo})$ | SBB5 + pHD63 |
| HDB87 | $\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuD}::\text{kan})2 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1$ $\Delta(\text{proHJ}::\text{zeo})$ | SBB2 + pHD63 |
| HDB88 | $\Delta(\text{opuA}::\text{tet})3 \Delta(\text{opuB}::\text{ery})1 \Delta(\text{opuC}::\text{spc})3$ $\Delta(\text{proHJ}::\text{zeo})$ | SBB3 + pHD63 |

4.1.2 Plasmide

Alle verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4 (bereits vorhandene Plasmide aus der Stammsammlung der AG Bremer), Tabelle 5 und Tabelle 6 (während dieser Arbeit konstruierte Plasmide) aufgelistet.

Tabelle 4: Bereits vorhandene Plasmide aus der Stammsammlung der AG Bremer.

| Plasmid | Beschreibung | Referenz |
|------------------|---|---|
| pENTRY | Kan ^R , Eintrittsvektor für StarGate [®] - Klonierung | IBA GmbH (Göttingen, DE) |
| pASG-IBA3 | Amp ^R , Expressionsvektor, <i>tet</i> -Promotor, erzeugt C-terminalen <i>Strep</i> -Tag am Protein | IBA GmbH (Göttingen, DE) |
| pASG-IBA5 | Amp ^R , Expressionsvektor, <i>tet</i> -Promotor, erzeugt N-terminalen <i>Strep</i> -Tag am Protein | IBA GmbH (Göttingen, DE) |
| pMal-c2 | Amp ^R , Expressionsvektor, <i>tac</i> -Promotor, C-terminale MalE-Fusion | New England BioLabs GmbH (Ipswich, MA, USA) |
| pX | Amp ^R , Cml ^R , Integrationsvektor <i>amyE::cml::amyE</i> | Kim et al., 1996 |
| pMT9 (pChen1) | Amp ^R , Cml ^R , pX-Derivat, <i>opuB</i> Operon mit nativem Promotor | Teichmann et al., 2017 |
| pChen3 | Amp ^R , Cml ^R , pX-Derivat, <i>opuC</i> Operon mit nativem Promotor | Teichmann et al., 2017 |
| p7Z6 | Amp ^R , Zeo ^R , pMD18-T Derivat, enthält <i>lox71-zeo-lox66</i> Kasette | Yan et al., 2008 |
| pJS13 | Amp ^R , pBluescriptSK ⁻ Derivat, enthält <i>rtp-proH-proJ-gltC</i> Region | Brill et al., 2011a |
| pTP1 | Amp ^R , pHD32 Derivat, Mutagenese CBS-BA V261A (GTA→GCA) | T. Pilarski |
| pTP2 | Amp ^R , pHD32 Derivat, Mutagenese CBS-BA R359A (AGG→GCG) | T. Pilarski |
| pTP3 | Amp ^R , pHD32 Derivat, Mutagenese CBS-BA S283A (TCA→GCA) | T. Pilarski |
| pTP4 | Amp ^R , pHD32 Derivat, Mutagenese CBS-BA Y343A (TAT→GCT) | T. Pilarski |
| pTP5 | Amp ^R , pHD32 Derivat, Mutagenese CBS-BA Y343F (TAT→TTT) | T. Pilarski |
| pTP11 | Amp ^R , pHD32 Derivat, Mutagenese CBS-BA V261E (GTA→GAA) | T. Pilarski |
| pTP12 | Amp ^R , pHD32 Derivat, Mutagenese CBS-BA K342E (AAA→GAA) | T. Pilarski |
| pTP13 | Amp ^R , pHD32 Derivat, Mutagenese CBS-BA Y343W (TAT→TGG) | T. Pilarski |
| pTP14 | Amp ^R , pHD32 Derivat, Mutagenese CBS-BA KY342/343P (AAATAT→GCG) | T. Pilarski |
| pTP19 | Amp ^R , pHD32 Derivat, Mutagenese CBS-BA D364K (GAC→AAA) | T. Pilarski |
| pTP23 | Amp ^R , pMT9 Derivat, Mutagenese OpuBA D364K (GAC→AAA) | T. Pilarski |
| pTP24 | Amp ^R , pMT9 Derivat, Mutagenese OpuBA K342E (AAA→GAA) | T. Pilarski |
| pTP26 | Amp ^R , pMT9 Derivat, Mutagenese OpuBA KY342/343P (AAATAT→GCG) | T. Pilarski |

Tabelle 5: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide.

| Plasmid | Beschreibung | Vaterplasmid |
|---------|---|--------------|
| pHD1 | Klonierung <i>opuBA</i> (1142bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über Lgul (Lgul-OpuBA-fw-1 und Lgul-OpuBA-rev-1) | pENTRY |
| pHD2 | Klonierung <i>opuCA</i> (1139bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über Lgul (Lgul-OpuCA-fw-1 und Lgul-OpuCA-rev-1) | pENTRY |
| pHD3 | Klonierung Faktor Xa Schnittstelle, <i>opuCA</i> (1139bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über Lgul (Lgul-Fak-XA-OpuCA-fw-1 und Lgul-OpuCA-rev-1) | pENTRY |
| pHD4 | Klonierung <i>opuAA</i> (1254bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über Lgul (Lgul-OpuAA-fw-1 und Lgul-OpuAA-rev-1) | pENTRY |
| pHD5 | Klonierung Faktor Xa Schnittstelle, <i>opuAA</i> (1254bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über Lgul (Lgul-Fak-XA-OpuAA-fw-1 und Lgul-OpuAA-rev-1) | pENTRY |
| pHD6 | Klonierung Faktor Xa, Schnittstelle, <i>opuBA</i> (1142bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über Lgul (Lgul-Fak-XA-OpuBA-fw-1 und Lgul-OpuBA-rev-1) | pENTRY |
| pHD7 | Verdau von pHD4 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA3 | pASG-IBA3 |
| pHD8 | Verdau von pHD4 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA5 | pASG-IBA5 |
| pHD9 | Verdau von pHD5 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA5 | pASG-IBA5 |
| pHD10 | Verdau von pHD1 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA3 | pASG-IBA3 |
| pHD11 | Verdau von pHD1 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA5 | pASG-IBA5 |
| pHD12 | Verdau von pHD6 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA5 | pASG-IBA5 |
| pHD13 | Verdau von pHD2 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA3 | pASG-IBA3 |
| pHD14 | Verdau von pHD2 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA5 | pASG-IBA5 |
| pHD15 | Verdau von pHD3 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA5 | pASG-IBA5 |
| pHD16 | Klonierung <i>CBS-opuBA</i> (378bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über Lgul (Lgul-OpuBA-CBS-fw-1 und Lgul-OpuBA-rev-1) | pENTRY |
| pHD17 | Klonierung <i>CBS-opuCA</i> (378bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über Lgul (Lgul-OpuCA-CBS-fw-1 und Lgul-OpuCA-rev-1) | pENTRY |
| pHD18 | Verdau von pHD16 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA3 | pASG-IBA3 |
| pHD19 | Verdau von pHD16 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA5 | pASG-IBA5 |
| pHD20 | Verdau von pHD17 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA3 | pASG-IBA3 |
| pHD21 | Verdau von pHD17 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA5 | pASG-IBA5 |
| pHD27 | Klonierung <i>CBS-opuAA</i> (438 bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über Lgul (Lgul-OpuAA-CBS-fw-1 und Lgul-OpuAA-rev-1) | pENTRY |
| pHD28 | Verdau von pHD27 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA3 | pASG-IBA3 |
| pHD29 | Verdau von pHD27 mit Esp3I und Ligation in pASG-IBA5 | pASG-IBA5 |
| pHD30 | Klonierung <i>opuAA</i> (1254bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über BamHI und PstI (<i>opuAA</i> -pMALc2-BamHI-fw und <i>opuAA</i> -pMALc2-PstI-rev) | pMal-c2 |
| pHD31 | Klonierung <i>CBS-opuAA</i> (438 bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über BamHI und PstI (<i>CBS-opuAA</i> -pMALc2-BamHI-fw und <i>opuAA</i> -pMALc2-PstI-rev) | pMal-c2 |
| pHD32 | Klonierung <i>CBS-opuBA</i> (378bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über BamHI und PstI (<i>CBS-opuBA</i> -pMALc2-BamHI-fw und <i>opuBA</i> -pMALc2-PstI-rev) | pMal-c2 |

Tabelle 6: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide (Fortsetzung).

| Plasmid | Beschreibung | Vaterplasmid |
|---------|--|--------------|
| pHD33 | Klonierung <i>CBS-opuCA</i> (378bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über BamHI und PstI (<i>CBS-opuCA</i> -pMALc2-BamHI-fw und <i>opuCA</i> -pMALc2-PstI-rev) | pMal-c2 |
| pHD34 | Klonierung <i>opuBA</i> (1146bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über Gibson Assembly (<i>OpuBA</i> -pMal-c2-gibson-fw und <i>OpuBA</i> -pMal-c2-gibson-rev) | pMal-c2 |
| pHD35 | Klonierung <i>opuCA</i> (1143bp) Fragment aus <i>B. subtilis</i> über Gibson Assembly (<i>OpuCA</i> -pMal-c2-gibson-fw und <i>OpuCA</i> -pMal-c2-gibson-rev) | pMal-c2 |
| pHD36 | Mutagenese <i>OpuBA</i> V261A (GTA→GCA) | pMT9 |
| pHD37 | Mutagenese <i>OpuBA</i> S283A (TCA→GCA) | pMT9 |
| pHD38 | Mutagenese <i>OpuBA</i> Y343A (TAT→GCT) | pMT9 |
| pHD39 | Mutagenese <i>OpuBA</i> Y343F (TAT→TTT) | pMT9 |
| pHD40 | Mutagenese <i>OpuBA</i> R359A (AGG→GCG) | pMT9 |
| pHD42 | Mutagenese <i>OpuBA</i> V261E (GTA→GAA) | pMT9 |
| pHD43 | Mutagenese <i>OpuBA</i> Y343W (TAT→TGG) | pMT9 |
| pHD53 | Mutagenese <i>OpuBA</i> Δ <i>CBS</i> -Domänen | pMT9 |
| pHD54 | Mutagenese <i>OpuCA</i> Δ <i>CBS</i> -Domänen | pChen3 |
| pHD63 | Amplifikation Zeocin-Kassette aus p7Z6 mit "pJS13 NsiI Zeo fw" und "pJS13 AvrII Zeo rev" und Klonierung in pJS13 über NsiI und AvrII | pJS13 |

4.1.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden durch die Firma Microsynth (Lindau, DE) synthetisiert und sind in den Tabellen 7,8,9 und 10 aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide.

| Klonierungsprimer:(Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen) | | |
|---|---|-----------------------|
| Oligonukleotid | Sequenz (5'- 3') | Konstruiertes Plasmid |
| Lgul-OpuBA-fw-1 | AAAGCTCTTCAATGCTGACATTAGAAAA TGTCTCG | pHD1 |
| Lgul-OpuBA-rev-1 | AAAGCTCTTCACCCTGACAATGCTGCGA GCTG | pHD1+6+16 |
| Lgul-OpuCA-fw-1 | AAAGCTCTTCAATGCTGAAATTGGAACAA GTGTCAAAG | pHD2 |
| Lgul-OpuCA-rev-1 | AAAGCTCTTCACCCGATCGTCATGAGCTGG TTTTC | pHD2+3+17 |
| Lgul-Fak-XA-OpuCA-fw-1 | AAAGCTCTTCAATGATCGAAGGTCGTCTG AAATTGGAACAAGTGTCAAAAG | pHD3 |
| Lgul-OpuAA-fw-1 | AAAGCTCTTCAATGAGTGATGAGAAACC AATTAAG | pHD4 |

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung).

| Klonierungsprimer: (Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen) | | |
|---|--|------------------------------|
| Oligonukleotid | Sequenz (5'- 3') | Konstruiertes Plasmid |
| Lgul-OpuAA-rev-1 | AAAGCTCTTCACCCTTTCACCTCCTGTGC AGAAG | pHD4+5+27 |
| Lgul-Fak-XA-OpuAA-fw-1 | AAAGCTCTTCAATGATCGAAGGTCGT AGTGTAGATGAGAAACCAATTAAG | pHD5 |
| Lgul-Fak-XA-OpuBA-fw-1 | AAAGCTCTTCAATGATCGAAGGTCGT CTGA- CATTAGAAAATGTCTCG | pHD6 |
| opuAA-pMALc2-BamHI-fw | AAAGGATCCATGAGTGTAGATGAG AAAC- CAATTAAG | pHD30 |
| opuAA-pMALc2-PstI-rev | AAACTGCAGTTATTTACCTCCTGTGCAGAAG | pHD30+31 |
| CBS-opuAA-pMALc2-BamHI-fw | AAAGGATCCATGAAACGCGCTGAAACAG | pHD31 |
| CBS-opuBA-pMALc2-BamHI-fw | AAAGGATCCATGAACACACAGCCTGTAACG | pHD32 |
| opuBA-pMALc2-PstI-rev | AAACTGCAGCTATGACAATGCTGCGAGCTG | pHD32 |
| CBS-opuCA-pMALc2-BamHI-fw | AAAGGATCCATGAACAGAACGCCGG | pHD33 |
| opuCA-pMALc2-PstI-rev | AAACTGCAGTCAGATCGTCATGAGCTGG | pHD33 |
| OpuBA-pMal-c2-gibson-fw | CGGGATCGAGGGAAGGATTTTCAGAATT CGGATTGCTGACATTAGAAAATGTCTCG | pHD34 |
| OpuBA-pMal-c2-gibson-rev | GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTT GC- CCTATGACAATGCTGCGAGCTGC | pHD34 |
| OpuCA-pMal-c2-gibson-fw | CGGGATCGAGGGAAGGATTTTCAGAATT CGGATTGCTGAAATTGGAACAAGTGTCAAAAG | pHD35 |
| OpuCA-pMal-c2-gibson-rev | GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTT GCCT- CAGATCGTCATGAGCTGGTTTTTC | pHD35 |
| pJS13 NsiI Zeo fw | AAAATGCATCGCCAGGGTTTTCCAGT | pHD63 |
| pJS13 AvrII Zeo rev | AAACCTAGGGAGCGGATAACAATTTACACAGG | pHD63 |

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung).

| Mutageneseprimer: Kleinbuchstaben = mutierte Nukleotide | | |
|--|------------------------------|-------------------------------------|
| Oligonukleotid | Sequenz (5'- 3') | Mutiertes Plas- mid |
| OpuBAmutV261A_fw | CACACAGCCTgcaACGATCACCG | pHD36 |
| OpuBAmutV261A_rev | TTCATAATCTGGTCAACCCGTTT | pHD36+42 |
| OpuBAmutS283A_fw | ACGGGTCGATgcaTTGCTGGTCG | pHD37 |
| OpuBAmutS283A_rev | TCCTGCCTCATCAGCTGAATG | pHD37 |
| OpuBAmutY343A_fw | GGGTGTCAAAgctGTTCCCGTTG | pHD38 |
| OpuBAmutY343A_rev | CGTTTTAAAATTTTGCGGAC | pHD38+39+43 |
| OpuBAmutY343F_fw | GGGTGTCAAAtttGTTCCCGTTG | pHD39 |
| OpuBAmutR359A_fw | AATTGTGACGgcgGCAAGTCTGGTCGAC | pHD40 |
| OpuBAmutR359A_rev | CCGATCAGGCGTCCGTCT | pHD40 |
| OpuBAmutV261E_fw | CACACAGCCTgaaACGATCACCG | pHD42 |
| OpuBAmutY343W_fw | GGGTGTCAAAtgGTTCCCGTTG | pHD43 |
| Q5 opuBA delCBS fw | TAGGGAGGGGCGATAAGT | pHD53 |
| Q5 opuBA delCBS rev | AATCTGGTCAACCCGTTT | pHD53 |
| Q5 opuCA delCBS fw | TGACCAGGGGAGGAGCTC | pHD54 |
| Q5 opuCA delCBS rev | TTGCTCTACCCGCTCGATATC | pHD54 |
| Sequenzierprimer | | |
| Oligonukleotid | Sequenz (5'- 3') | Ziel der Se- quenzierung |
| pASK_IBA_F | GTGAAATGAATAGTTCGAC | pASG-IBA3/5 Konstrukte |
| pASK_IBA_R | CGCAGTAGCGGTAAACGGC | pASG-IBA3/5 Konstrukte |
| pMal-C2-Seq_fw | GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC | pMal-c2 Kon- strukte |
| pMal-c2 Seq_rev | CATCCGCCAAAACAGCCAAG | pMal-c2 Kon- strukte |
| OpuBF | CGGTTTCATCCTTTTCAGCTAACAATTC | <i>opuB</i> + Derivate in pMT9 |
| OpuB seq1 | TTCAGCAGAATATCTCACTCGTCC | <i>opuB</i> + Derivate in pMT9 |
| OpuB seq2 | AAACGCTTTCTGAGGCCATTTCAGC | <i>opuB</i> + Derivate in pMT9 |
| OpuB seq2,5 | CGATATCGCTCATTGCTGTGATC | <i>opuB</i> + Derivate in pMT9 |

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung).

| Sequenzierprimer | | |
|---|--------------------------------|----------------------------------|
| Oligonukleotid | Sequenz (5'- 3') | Ziel der Sequenzierung |
| OpuB seq3 | GCGGCGGATTGGGTGATTACATTT | <i>opuB</i> + Derivate in pMT9 |
| OpuB seq3,5 | CGGTGCAGCAGCAGGCTTTAATG | <i>opuB</i> + Derivate in pMT9 |
| OpuB seq4 | TGTGCTTGCGTATTCAACCGATGG | <i>opuB</i> + Derivate in pMT9 |
| OpuB seq5 | GGCGGGCCTTCGCACGGCTCTCGTC | <i>opuB</i> + Derivate in pMT9 |
| OpuC seq1 | CAGAAAATTTAAAGGAAACCTGCGGAGG | <i>opuB</i> + Derivate in pChen3 |
| OpuC seq2 | CCCACGATATGGATGAAGCGATTAAGC | <i>opuB</i> + Derivate in pChen3 |
| OpuC seq3 | CTGACCAGGGGAGGAGCTCTTTAAGATG | <i>opuB</i> + Derivate in pChen3 |
| OpuC seq4 | GAATATATCATTGGCGGTGCCGTGCCTGTC | <i>opuB</i> + Derivate in pChen3 |
| OpuC seq5 | GGAGCATATTAACACCGTGTCTGACCTG | <i>opuB</i> + Derivate in pChen3 |
| OpuC seq6 | GCTCGGCATCCTGATAGCCAGATACAGAAG | <i>opuB</i> + Derivate in pChen3 |
| OpuC seq7 | CATCCCTTCAAATGGCAATTGATGGTGTC | <i>opuB</i> + Derivate in pChen3 |
| PCR Primer für Cre/lox Verfahren | | |
| Oligonukleotid | Sequenz (5'- 3') | Bemerkung |
| cdaA Del Kan-cre fw | GTGGTATAATGGGCTCGCTATG | Kontrolle Deletion <i>cdaA</i> |
| cdaA Del Kan-cre rev | CCGCCACATAAAGCAAGAGC | Kontrolle Deletion <i>cdaA</i> |
| cdaS Del Kan-cre fw | CGAAATCACGCCTAAAAAGGTG | Kontrolle Deletion <i>cdaS</i> |
| cdaS Del Kan-cre rev | CATTCAGCTTGAAGCGAATGC | Kontrolle Deletion <i>cdaS</i> |
| disA Del Kan-cre fw | CGGCAAATCTGGATGGATGG | Kontrolle Deletion <i>disA</i> |
| disA Del Kan-cre rev | CGCCAAAATAATGAAGAACGCC | Kontrolle Deletion <i>disA</i> |
| Kan ^R -Gross-Bs-fw | GCAGGCGAGAAAGGAGAG | PCR auf Kan-Kassette |
| Kan ^R -Gross-Bs-rev | CGAGGCTCCTGTCACTGC | PCR auf Kan-Kassette |

4.2 Materialien und Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammen, insofern im Text nichts anderes erwähnt ist, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, DE), AppliChem (Darmstadt, DE), Merck (Darmstadt, DE), InvivoGen (San Diego, CA, USA) und Sigma-Aldrich (Steinheim, DE). Amylose-Resin für die Affinitätschromatografie wurde von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) bezogen. Von Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE) wurden Kits zur Plasmid-Präparation und DNA-Reinigung, Größenstandards, Restriktionsenzyme, Ligasen, dNTP's und Phosphatasen bezogen. Cyclische Dinukleotide stammen von Jena Bioscience (Jena, DE).

4.3 Mikrobiologische Methoden

4.3.1 Grundmedien

Für Vorkulturen und Stammhaltung wurden *E. coli* und *B. subtilis* standardmäßig in LB-Medium (Luria-Bertani) bei 37 °C kultiviert. Für Festmedien wurde zum Medium 1,5 % Agar hinzugegeben. Zur heterologen Produktion von Proteinen in *E. coli* wurde modifiziertes Minimalmedium A (MMA, Tabelle 11) (Miller, 1972) verwendet. Es wurde modifiziert durch die Zugabe von 0,2 % Glukose (w/v), 0,1 % Casaminoäuren (w/v), 0,5 mg/L Thiamin und 1 mM MgSO₄.

Tabelle 11: Minimalmedium A für *E. coli*.

| Komponente | Einwaage (g/L) |
|-----------------------------------|----------------|
| K ₂ HPO ₄ | 10,5 |
| KH ₂ PO ₄ | 4,5 |
| (NH ₄)SO ₄ | 1,0 |
| NaCitrat x 2 H ₂ O | 0,5 |

B. subtilis wurde für Wachstumsversuche in Spizizen's Minimalmedium (SMM, siehe Tabelle 12) (Spizizen, 1958) kultiviert mit Spurenelementen (Harwood und Archibald) und mit 0,5 % Glukose als Kohlenstoffquelle. Um die Auxotrophien des Wildtyps JH642 (*trpC2 pheA1*) zu komplementieren, wurden dem Minimalmedium 20 mg/L L-Tryptophan und 18 mg/L L-Phenylalanin hinzugegeben. Mit einer 5 M NaCl Stammlösung wurde die Osmolarität des Mediums auf den gewünschten Wert erhöht.

Für Wachstumsexperimente in Natrium-SMM (Na-SMM) wurde die Menge Kaliumphosphat sowie die Stickstoffquelle aus SMM äquimolar ersetzt. Zusätzlich wurde Kalium in Form von KCl in der gewünschten Konzentration hinzugegeben.

Tabelle 12: Minimalmedium für *B. subtilis*.

| | Komponente | Einwaage (g/L) |
|----------------------|---|----------------|
| 5 x SMM | K ₂ HPO ₄ | 70 |
| | KH ₂ PO ₄ | 30 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 10 |
| | Na ₃ Citrat x 2H ₂ O | 5 |
| | MgSO ₄ x 7H ₂ O | 1 |
| 100 x Spurenelemente | CaCl ₂ | 0,55 |
| | FeCl ₂ x 6 H ₂ O | 1,35 |
| | MnCl ₂ x 4 H ₂ O | 0,10 |
| | ZnCl ₂ | 0,17 |
| | CuCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,05 |
| | CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 0,06 |
| | Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 0,06 |

4.3.2 Medienzusätze und kompatible Solute

Alle Antibiotika, kompatiblen Solute und Medienzusätze wurden als Stammlösungen angesetzt (in H₂O, 70 % EtOH oder DMF) und durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert. Die Zugabe erfolgte nach dem Sterilisieren und Abkühlen vom jeweiligen Medium.

Tabelle 13: Verwendete Antibiotika und Medienzusätze.

| Medienzusatz | Stammlösung | Endkonzentration | |
|-----------------|------------------------------|------------------|--------------------|
| | | <i>E. coli</i> | <i>B. subtilis</i> |
| Ampicillin | 100 mg/mL (H ₂ O) | 100 µg/mL | - |
| Erythromycin | 2 mg/mL (70 % EtOH) | - | 2 µg/mL |
| Spectinomycin | 100 mg/mL (H ₂ O) | - | 100 µg/mL |
| Tetracyclin | 10 mg/mL (70 % EtOH) | - | 10 µg/mL |
| Chloramphenicol | 5 mg/mL (70 % EtOH) | - | 5 µg/mL |
| Zeocin | 100 mg/mL (H ₂ O) | - | 35 µg/mL |
| Kanamycin | 50 mg/mL (H ₂ O) | 50 µg/mL | 10 µg/mL |
| Gentamicin | 20 mg/mL (H ₂ O) | 20 µg/mL | - |
| IPTG | 1 M (H ₂ O) | 0,5 mM | 0,5 mM |
| AHT | 2 mg/mL (DMF) | 0,2 µg/mL | - |
| X-Gal | 25 mg/mL (DMF) | 25 µg/mL | - |

4.3.3 Sterilisation

Hitzestabile Medien und Puffer wurden routinemäßig für eine Stunde bei 121 °C im Autoklav und hitzestabile Glaswaren für mindestens drei Stunden bei 180 °C sterilisiert. Hitzeempfindliche Medienzusätze wie Spurenelemente, Antibiotika und kompatible Solute wurden mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

4.3.4 Kultivierung von Bakterien

Alle *B. subtilis* und *E. coli* Stämme wurden standardmäßig aus Glycerin-Dauerkulturen (siehe 4.3.6) auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für Plasmid-Stämme war ein entsprechendes Antibiotikum enthalten. Von frisch bewachsenen LB-Platten wurden jeweils mit Einzelkolonien 3-5-mL LB-Vorkulturen angeimpft und in Röhrchen auf einem Roller bei 37 °C inkubiert. Für heterologe Produktionen in *E. coli* wurden aus der LB-Vorkultur 0,5 - 1 L MMA angeimpft und bei 37 °C kultiviert (für Details siehe 4.6.1). Für alle Kultivierungen von *E. coli* Arctic (mit Ausnahme der MMA-Hauptkulturen der Produktion) wurde zusätzlich Gentamicin zum Medium hinzugefügt, da dieser Stamm schon ein Plasmid enthält, auf dem spezielle Chaperone kodiert sind, welche die Faltung von Proteinen bei niedrigeren Temperaturen (18 °C) erleichtern. Für *B. subtilis* wurden mit der LB-Vorkultur 20 mL SMM / Na-SMM angeimpft und als zweite Vorkultur bis zu einer OD_{578} von 1,0 im Wasserbad schüttelnd bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Diese Vorkultur wurde je nach Experiment für verschiedene Hauptkulturen verwendet. Für Wachstumskurven wurden mit 50 µL SMM-Vorkultur jeweils 450 µL Medium (Basis SMM / Na-SMM) in einer 48-Wellplate (Cellstar 48 Well Suspension Culture Plate, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Ö) beimpft. Anschließend erfolgte die Kultivierung in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Synergy H1, BioTek Instruments, Winooski, USA) bei 37 °C und 807 doppel-orbitalem Schütteln. Um Zellen für die Messung von intrazellulärem c-di-AMP (siehe 4.5.3) zu ernten, wurden aus der Vorkultur jeweils 80 mL SMM mit verschiedenen Konzentrationen NaCl (0 - 1,2 M) auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD_{578} von 1,5 - 1,7 kultiviert um eine Adaption der Zellen an die hochosmolaren Bedingungen mit 3-4 Generationen zu erreichen. Für Osmoprotektionsexperimente wurden mit jeweils 150 µL LB Vorkultur 5 mL einer SMM Vorkultur angeimpft und auf einem Roller bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD_{578} von ~ 1,0 wurde eine 5 mL SMM Hauptkultur auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und für 16 Stunden auf einem Roller bei 37 °C inkubiert.

4.3.5 Ermittlung der Zelldichte

Die Zelldichte von *E. coli* und *B. subtilis* in Flüssigkulturen wurde mittels Photometer (Amersham Bioscience, Ultrospec 3100 pro, Freiburg, DE) bei einer Wellenlänge von 578 nm (OD_{578}) bestimmt. Es wird dabei angenommen, dass 1 mL Zellen mit einer OD_{578} von 1 circa 1×10^9 Zellen enthält (Miller, 1972). Als Referenz diente dabei das Kultivierungsmedium und ab einer Zelldichte von $OD_{578} = 0,3$ wurde die Probe verdünnt.

4.3.6 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurde für alle Bakterienstämme eine 5 mL-LB Kultur von einer frisch bewachsenen LB-Platte beimpft und über Nacht auf einem Roller bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden pro Kultur 1,7 mL 80 % Glycerin hinzugefügt, gut gemischt und die Stämme in Cryo-Gefäßen bei -80 °C gelagert.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Präparation von genomischer DNA aus *B. subtilis*

Für die Präparation genomischer DNA aus *B. subtilis*, wurden 5 mL LB mit einer Einzelkolonie beimpft und für 3 Stunden bei 37 °C auf einem Roller inkubiert. Anschließend erfolgte die Präparation nach dem Protokoll von Marmur (Marmur und Doty, 1961). Die DNA wurde in 100 µL dH₂O aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

4.4.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurde der entsprechende Plasmid-Stamm über Nacht in 5-10 mL LB mit passendem Antibiotikum bei 37 °C kultiviert. Die Isolierung erfolgte dann mittels GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific [Dreieich, DE]) nach Protokoll des Herstellers. Für größere Plasmid-Mengen wurden bis zu 200 mL Kultur verwendet und die Plasmide mittels Plasmid Midi Kit von QIAGEN (Hilden, DE) nach Herstellerangaben isoliert.

4.4.3 Amplifikation und Reinigung von DNA

Die Amplifikation von DNA Fragmenten erfolgte mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) nach dem Protokoll der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase der Firma Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE). Als Template in einem 50 µL Reaktionsansatz diente entweder 50 ng genomische DNA oder 10 ng Plasmid-DNA. Für die Reinigung von amplifizierten DNA Fragmenten sowie von linearisierten Plasmiden wurde das GeneJET PCR Purification Kit von Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die eluierte DNA wurde in 20-50 µL dH₂O aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Um die DNA Konzentration zu erhöhen, wurde die DNA gefällt. Zu 1 Volumen DNA wurden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 sowie 2 Volumen 96 % Ethanol hinzugegeben und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Das Pelletieren der gefällten DNA erfolgte bei 4 °C und 16620 x g für 30 Minuten, anschließend wurde das Pellet mit 70 % gewaschen, getrocknet und in 20-40 µL dH₂O aufgenommen.

4.4.4 Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation von DNA

Für die Linearisierung von amplifizierten DNA-Fragmenten und Plasmiden wurden FastDigest Restriktions-Enzyme verwendet. Anschließend wurde die linearisierte Vektor-DNA mit einer thermosensitiven, alkalischen Phosphatase (FastAP) an den 5'Enden dephosphoryliert und gereinigt (siehe 4.4.3), um bei der folgenden Ligation die Anzahl an Re-Liganden zu reduzieren. Für die Ligation wurde die T4 DNA Ligase verwendet. Alle Schritte erfolgten nach Protokoll des Herstellers Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE).

4.4.5 Gibson Assembly

Als Alternative zur standardisierten Klonierungsvariante mit Restriktionsverdau und Ligation mittels T4 Ligase, erfolgten einige Klonierungen in dieser Arbeit mittels Gibson Assembly. Die-

se Methode wurde von Daniel G. Gibson etabliert (Gibson et al., 2009). Das Gibson Assembly funktioniert mittels Überhängen von 20-30 bp zwischen dem Vektor und dem Insert jeweils am 5' und am 3' Ende. Diese Überhänge wurden durch die Primer generiert, welche zur Amplifikation des Inserts genutzt wurden. Der Vektor wurde nach Herstellerangaben zunächst mittels Restriktionsenzym verdaut und das Insert mittels PCR amplifiziert. Gereinigter Vektor und PCR Produkt wurden im Anschluss daran äquimolar gemischt, sodass sich eine Gesamtmenge von 150 ng ergibt. Die Mischung wurde auf 5 µL aufgefüllt und mit 15 µL des Gibson Reaktionsmixes (siehe Tabelle 14) gemischt. Die Gesamtreaktion wurde für eine Stunde bei 50 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend direkt in eine Transformation von *E. coli* TOP 10 eingesetzt.

Tabelle 14: Zusammensetzung des 5x Isothermalen Reaktionsmixes und des Gibson Reaktionsmixes für das Gibson Assembly.

| | Komponente | Menge |
|-------------------------------------|-------------------------------------|----------|
| 5 x Isothermaler Reaktionsmix | 1 M Tris-HCl (pH 7,5) | 3 mL |
| | 1 M MgCl ₂ | 300 µL |
| | je 100 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP | Je 60 µL |
| | 1 M DTT | 300 µL |
| | PEG-8000 | 1,5 |
| | 10 mM NAD | 300 µL |
| Gibson Reaktionsmix (für 1,2 mL) | 5x Isothermaler Reaktionsmix | 320 µL |
| | 10 U/µL T5 Exonuklease | 0,64 µL |
| | 2U/µL Phusion DNA Polymerase | 20 µL |
| | 40000 U/µL Taq DNA Ligase | 0,16 µL |
| | ddH ₂ O | 860 µL |

4.4.6 StarGate®- Klonierung

Um Expressionsplasmide mit *Strep*-Tag sowohl für die ATPasen OpuAA, OpuBA und OpuCA als auch die jeweiligen CBS-Domänen zu erstellen, wurde die StarGate® - Klonierung (IBA, Göttingen, DE) genutzt. Diese Klonierungsvariante funktioniert in zwei Schritten. Zunächst wurde das Ziel-Gen in den Eintrittsvektor pENTRY integriert. Dafür wurde beim Forward und Reverse Primer jeweils eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym LglI am 5' Ende angehängen. Zusätzlich wurde noch eine Primer-Variante designt, bei der zusätzlich noch eine Schnittstelle für die Protease Faktor Xa eingefügt wurde, um nach der Aufreinigung der Proteine den *Strep*-Tag wieder entfernen zu können. Nach der Amplifikation der Gene bzw. der CBS-Domänen von der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 erfolgten Verdau und Ligation des jeweiligen PCR Produkts und pENTRY in einem Schritt (siehe Tab. 15). Daraufhin wurde *E. coli* TOP 10 mit 30 µL des Reaktionsansatzes transformiert und auf Platten mit LB, Kanamycin und X-Gal ausplattiert. Da bei erfolgreicher Klonierung in pENTRY das funktionelle *lacZ* Gen durch das Zielgen ersetzt wird, sind die richtigen Klone auf der Platte weiß, wohingegen Re-Liganden blau sind. Nach Plasmidpräparation und -sequenzierung erfolgte die Klonierung in die Akzeptor-

vektoren wiederum mittels eines Ein-Schritt-Protokolls. Hierbei wurden zwei Vektor-Varianten genutzt. Zum einen war das der Vektor pASG-IBA3 für ein C-terminalen *Strep*-Tag und der Vektor pASG-IBA5 für einen N-terminalen *Strep*-Tag. Nach der Transformation von *E. coli* TOP10 mit dem Reaktionsansatz erfolgte auch hier die Auswahl der richtigen Klone mittels Blau-Weiß-Selektion.

Tabelle 15: Reaktionsansätze für die StarGate®-Klonierung.

| Komponente | Volumen (µL) |
|---|--------------|
| 10x Tango Puffer | 5 |
| 100 mM DTT | 5 |
| 10 mM ATP | 2,5 |
| T4 Ligase (1 U/µL) | 1 |
| a) Für die Ligation in den Eintrittsvektor pENTRY | |
| PCR Produkt | X (100 ng) |
| pENTRY | X (25 ng) |
| Lgus (5 U/µL) | 0,5 |
| ad 50 µL (H ₂ O) | |
| b) Für die Ligation in die Akzeptorvektoren | |
| pENTRY mit Insert | X (100 ng) |
| pASG-IBA3/5 | X (25 ng) |
| Esp3I (10 U/µL) | 0,5 |
| ad 50 µL (H ₂ O) | |

4.4.7 Agarose-Gelelektrophorese

PCR Fragmente, Plasmiden und chromosomale DNA wurden mittels Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Für ein 1 % Agarose Gel wurde 1 g Agarose in 100 mL 1x TAE Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) aufgekocht. Die Proben (5 µL) wurden mit 1 µL 6 x DNA Loading Dye versetzt und als Größenstandard diente der Gene Ruler 1kb Plus. Der Lauf erfolgte ebenfalls in 1x TAE bei einer Spannung von 120 V. Nach der Auftrennung wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/mL in H₂O) für 10 Minuten inkubiert und die DNA darauf anschließend mittels UV-Durchlicht bei einer Wellenlänge von 302 nm visualisiert.

4.4.8 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die Konzentration von DNA-Fragmenten zu ermitteln, wurde die Absorption bei 260 nm mit einem Nano-Drop® - Spektrophotometer (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, DE) bestimmt.

4.4.9 Gerichtete Mutagenese

Um gezielte Mutationen in Plasmide einzuführen, wurde das Q5® Site Directed Mutagenesis Kit der Firma New England BioLabs GmbH (Ipswich, MA, USA) nach Herstellerangaben ver-

wendet, mit Ausnahme der Transformation, welche mit *E. coli* TOP10 Zellen erfolgte. Die dafür benötigten Oligonukleotide wurden mittels NEBaseChanger (<https://nebasechanger.neb.com/>) designt und sind in Tabelle 8 aufgelistet.

4.4.10 Deletion von Genen mithilfe des Cre/lox Verfahrens

Um in einem Stamm mehrere Gene markerlos zu deletieren, wurde das Cre/lox Verfahren angewendet. Für die Deletionen wurde eine Bibliothek genutzt, welche in der Arbeitsgruppe von Carol Gross (Koo et al., 2017) erstellt wurde. Darin sind *B. subtilis* 168 Stämme enthalten, welche jeweils eine einzelne Deletion eines Gens enthalten, die entweder mit einer Kanamycin oder einer Erythromycin Resistenz markiert sind. Die Besonderheit an den deletierten Genen ist, dass die Resistenzkassetten von sogenannten *lox*-Schnittstellen umgeben sind (*lox71* am 5'Ende, *lox66* am 3'Ende). Diese *lox*-Schnittstellen werden vom Enzym Cre-Rekombinase erkannt. Induziert man die Cre-Rekombinase, rekombiniert diese durch ihre Aktivität die jeweilige Resistenzkassette heraus und hinterlässt an der Stelle eine kurze *lox72* Sequenz. Dadurch ist die gewünschte Deletion letztendlich markerlos (Yan et al., 2008).

Die Durchführung des Verfahrens während dieser Arbeit ist in Abb. 8 gezeigt: Zunächst wurde der Stamm mit der Deletion des gewünschten Gens inklusive Kanamycin Kassette aus der oben genannten Bibliothek ausgewählt. Mithilfe dessen chromosomaler DNA erfolgte die Deletion des Gens im Wildtypstamm JH642 mit anschließender Selektion der Klone auf Kanamycin (Abb. 8, (1)). Im nächsten Schritt erfolgte die Integration des *cre* Gens. Dieses befindet sich mit einem IPTG-induzierbarem Promotor und markiert mit einer Spectinomycin Resistenz integriert im Gen *lacA* im Stamm BPSC13. Die Cre-Rekombinase wurde mittels Transformation in *lacA* des zuvor erstellten Stamms integriert und die Klonen auf Spectinomycin selektiert (Abb. 8, (2)). Im resultierenden Stamm (Kanamycin- und Spectinomycin-resistent) erfolgte im Anschluss die Induktion der Cre-Rekombinase. Hierfür wurde ein gereinigter Klon in 5 mL LB + 0,5 mM IPTG angeimpft und für 8 Stunden bei 37 °C kultiviert. Von dieser Kultur wurde eine Verdünnungsreihe in LB Medium angelegt und die Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-6} auf LB Platten mit 0,5 mM IPTG ausplattiert (Abb. 8, (3, 4)). Bei erfolgreicher Aktivität der Cre-Rekombinase sollte an dieser Stelle die Kanamycin-Kassette heraus rekombiniert sein. Aus diesem Grund wurden 30 Klone ausgewählt und sowohl auf LB Platten als auch auf LB Platten mit Kanamycin überführt. Klone, welche Kanamycin-sensitiv waren, wurden im Anschluss daran zusätzlich per PCR auf die fehlende Resistenzkassette überprüft. Durch die markerlose Deletion im entstandenen Stamm konnten anschließend weitere Gene mittels dieses Verfahrens deletiert werden.

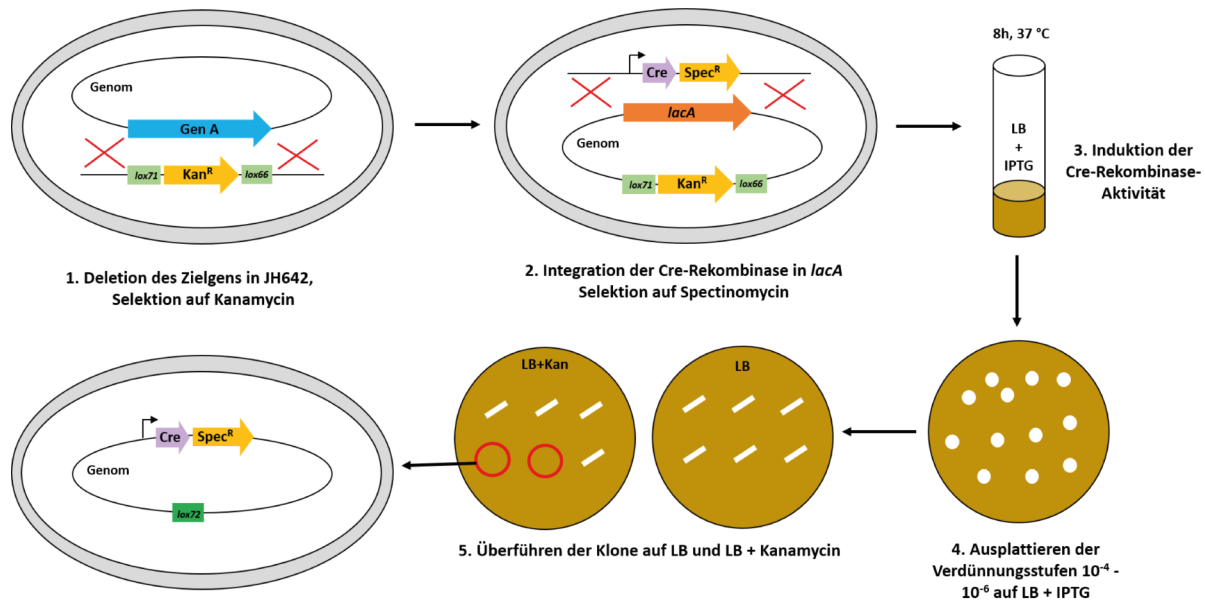


Abbildung 8: Vorgehen bei der markerlosen Deletion von Genen mithilfe der Cre-Rekombinase. (1) Deletion des gewünschten Gens mit Resistenzkassette und lox-Schnittstellen, Selektion der Klone auf Kanamycin. (2) Integration der Cre-Rekombinase mit IPTG-induzierbarem Promotor in lacA, Selektion der Klone auf Spectinomycin. (3, 4) Induktion der Cre-Rekombinase und damit heraus-Rekombinieren der Resistenzkassette durch Kultivierung des Stamms in LB + 0,5 mM IPTG. (5) Testen auf Kanamycin-Sensitivität durch Überführen der Klone auf LB und LB + Kanamycin.

4.4.11 Sequenzierung

Sequenzierungen von klonierten DNA-Fragmenten und mutierten Plasmiden wurden mittels der Methode nach Sanger von der Firma Microsynth (Balgach, CH) oder Eurofins Genomics (Ebersberg, DE) durchgeführt. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 8 aufgelistet. Das Programm SnapGene® (GSL Biotech, snapgene.com) wurde für die Analyse der erhaltenen Sequenzen verwendet.

4.4.12 Transformation von *E. coli* und *B. subtilis*

4.4.12.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Methode von Sambrook und Russel (Sambrook und Russell, 2001). Hierfür wurde eine 5 mL LB-Vorkultur mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Roller inkubiert. Als Hauptkultur wurden 200 mL LB-Medium mit der Vorkultur auf OD₅₇₈ = 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,3-0,5 bei 37 °C und 200 rpm auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Die Kultur wurde anschließend auf Eis abgekühlt und die Zellen bei 4863 x g und 4 °C für 10 Minuten pelletiert. Die Zellen wurden mit 16 mL kaltem CaCl₂ (0,1 M) gewaschen, in 0,1 M CaCl₂ mit 15 % Glycerin resuspendiert und aliquotiert (je 100 µL). Die Aliquots wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Bei der Herstellung chemisch kompetenter Zellen des Stamms *E. coli* Arctic wurde zu allen Kulturen Gentamicin hinzugegeben, da dieser Stamm schon ein Plasmid enthält, auf dem spezielle Chaperone kodiert sind, welche die Faltung von Proteinen bei niedrigeren Temperaturen (18 °C) erleichtern.

4.4.12.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen aufgetaut, mit 100-300 ng Plasmid DNA, einem Ligations-Ansatz (siehe 4.4.4) oder einem Mutagenese-Ansatz (siehe 4.4.9) versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden, woraufhin der Ansatz auf Eis für 2 Minuten abgekühlt wurde. Nach dem Hinzufügen von 1 mL LB-Medium wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C und 700 rpm auf einem Thermoblock inkubiert und anschließend auf LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert.

4.4.12.3 Transformation natürlich kompetenter *B. subtilis* Zellen

Die natürliche Kompetenz von *B. subtilis* beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase wurde sich bei der Transformation nach der Methode von Cutting und Vander Horn (Cutting und Vander-Horn, 1990) zu Nutze gemacht (Dubnau, 1991). Für die Vorkultur wurden 3 mL SMM mit einer Einzelkolonie von einer frischen LB-Platte beimpft und für 16 Stunden bei 37 °C auf einem Roller inkubiert. Mit 1 mL der Vorkultur wurden 20 mL vorgewärmtes LS-Medium angeimpft und für drei Stunden im Wasserbad bei 100 rpm inkubiert. Anschließend wurde in einem 2 mL Eppendorf Gefäß entweder 3-5 µg linearisierte Plasmid-DNA oder 500 ng genomische DNA vorgelegt, 1 mL der *B. subtilis* Kultur hinzugegeben, der Ansatz für 2 Stunden bei 37 °C auf einem Roller inkubiert und auf LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert.

4.5 Biochemische Methoden

4.5.1 Nachweis der Amylase-Aktivität

Durch homologe Rekombination wurden Gene, die für OpuB, OpuC oder Derivate der beiden Transporter kodieren, mit Hilfe von rekombinatorischen Flanken stabil in das *amyE* Gen von *B. subtilis* integriert. *amyE* kodiert eine extrazelluläre alpha-Amylase, durch die *B. subtilis* Stärke abbauen kann, welche aber nicht essenziell ist. Wurde ein Gen erfolgreich in *amyE* integriert, sollte *B. subtilis* nicht mehr in der Lage sein, Stärke abzubauen. Um das zu testen, wurden die Klone nach der Transformation und Reinigung auf LB-Platten mit 1 % Stärke ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C führt das Hinzugeben einer Iod-Kaliumiodid-Lösung [0,5 % (w/v) Iod, 1 % (w/v) Kaliumiodid] zur Violett-Färbung der Stärke. Bei Amylase-positiven Bakterien ist ein nicht gefärbter Hof rund um die Kolonie durch die Spaltung der Stärke zu Glukose sichtbar, bei erfolgreicher Integration eines anderen Gens in *amyE* fehlt er hingegen.

4.5.2 Bestimmung der intrazellulären Prolin Konzentration

Für die Bestimmung der intrazellulären Prolin-Menge wurde die Ninhydrin-Methode nach Bates (Bates et al., 1973) verwendet. Dabei wird sich zu Nutze gemacht, dass Ninhydrin bei saurem pH-Wert einen roten Farbkomplex mit sekundären Aminosäuren wie Prolin bildet. Dieser kann bei 480 nm photometrisch gemessen werden und die Intensität des roten Farbstoffes steigt mit zunehmender Prolin-Konzentration nach dem Lambert Beerschen Gesetz. Für die Bestimmung

der intrazellulären Prolin-Konzentration in *B. subtilis* wurden die Zellen in SMM mit verschiedenen Osmolaritäten bis zu einer OD₅₇₈ von 1,5-1,8 kultiviert. Von der Kultur wurden 8 mL Zellen bei 20 °C und 4863 x g für 10 Minuten pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen bei -20 °C gelagert. Für den Zellaufschluss wurden die Pellets in 900 µL 3 % Sulfosalicylsäure (SSA) aufgenommen und über Nacht bei 22 °C und 800 rpm auf einem Thermoblock inkubiert. Das Abtrennen der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation bei 16620 x g für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Aufgrund der zu erwartenden hohen Prolin-Konzentration bei höherer Osmolarität, wurden alle Proben von Zellen, die bei 0,8 M NaCl oder mehr gewachsen waren, an dieser Stelle 1:10 verdünnt. 500 µL von jeder Probe wurden anschließend mit 500 µL Ninhydrin-Lösung (1,25 g Ninhydrin in 30 mL Essigsäure + 20 mL 6 M Phosphorsäure) sowie 500 µL Essigsäure versetzt und für eine Stunde im kochenden Wasser inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis erfolgte die Zugabe von je 2 mL Toluol, die Proben wurden anschließend für 10 Minuten bei 2458 x g zentrifugiert. Die obere Phase, welche den Prolin-Ninhydrin Farbkomplex enthält, wurde dann bei 480 nm vermessen. Für den Blindwert wurde reines Toluol und für die Kalibriergerade in SSA gelöstes Prolin (0 - 0,8 mM) genutzt.

4.5.3 Bestimmung der intrazellulären c-di-AMP Konzentration

Die Messung der intrazellulären c-di-AMP Konzentration erfolgte in Kooperation mit der ZFA Metabolomics der Medizinischen Hochschule Hannover. Hierfür wurden zunächst die *B. subtilis* Zellen wie unter 4.3.4 beschrieben kultiviert. Nach dem Wachstum bis zu einer OD₅₇₈ von 1,5-1,7 wurden von jeder biologischen Parallele drei Mal 15 mL Zellen geerntet (15 min, 4863 x g, 4 °C), anschließend zwei Mal im jeweiligen Medium gewaschen, die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert. Für den Zellaufschluss wurden die Zellen aufgetaut, in 300 µL TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) mit 2 mg/mL Lysozym resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur und 750 rpm auf einem Thermoblock inkubiert. Die Lysate wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und 10 Minuten bei 95 °C gekocht. Die Extraktion von c-di-AMP erfolgte durch die Zugabe von 1 mL einer 1:1 Methanol/Acetonitril Mischung. Die Proben wurden daraufhin 30 Sekunden gevortext, 15 Minuten auf Eis inkubiert und für 10 Minuten bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet zwei Mal in 300 µL einer 1:1:1 Methanol/Acetonitril/Wasser Mischung aufgenommen, analog zu Schritt 1 der Extraktion auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Die Überstände der drei Extraktionsschritte wurden vereinigt (~1,9 mL), über Nacht bei -20 °C inkubiert und am nächsten Tag erneut zentrifugiert (10 min, 20000 x g, 4 °C). Anschließend wurden die Proben mittels SpeedVac komplett getrocknet und anschließend für die c-di-AMP-Messung zur ZFA Metabolomics in Hannover verschickt.

4.6 Proteinbiochemische Methoden

4.6.1 Heterologe Produktion von Proteinen

Für die heterologe Produktion der kompletten ATPasen (Plasmide pHD30 [OpuAA], pHD34 [OpuBA] und pHD35 [OpuCA]) sowie der CBS-Domänen (Plasmide pHD31 [CBS-AA], pHD32

[CBS-BA] und pHD33 [CBS-CA]), welche im Vektor pMal-c2 am C-Terminus mit dem Maltose-Bindeprotein von *E. coli* fusioniert sind, wurde *E. coli* BL21 mit den jeweiligen Plasmiden transformiert und die Klone auf LB Platten mit Ampicillin selektioniert. Für die Expression befindet sich ein *lac*-Promotor stromaufwärts vom MBP, welcher mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbar ist. Als Vorkultur wurden 20 mL LB + Ampicillin mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Als Expressionskultur dienten 500 mL oder 1 L MMA in einem 2-Liter-Schikanekolben, welches auf OD₅₇₈ = 0,1 mit der Vorkultur angeimpft wurden. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 bis 0,7 woraufhin die Expression mit 0,5 mM IPTG für 2 Stunden induziert wurde. Für die Zellernte wurden die Zellen für 15 Minuten bei 4 °C und 2360 x g zentrifugiert und die Zellpellets anschließend bei -20 °C gelagert. Für ein SDS Gel (siehe 4.6.7) wurden sowohl vor als nach der Induktion aus jeder Kultur je 1 mL Zellen abgenommen, zentrifugiert (10 min, 16620 x g, RT) und die Zellpellets bei -20 °C gelagert.

Für die Produktion der Proteine, welche im Vektor pASG-IBA3 C-terminal oder in pASG-IBA5 N-terminal mit einem *Strep*-Tag fusioniert sind, erfolgte die Produktion auf eine ähnliche Art und Weise. Da die Genexpression bei diesen Vektoren durch einen Anhydrotetracyclin-induzierbaren Promotor kontrolliert wird, erfolgte die Induktion der Expression mit der Zugabe von 0,2 mg/mL AHT. Für die Produktion dieser Proteine im Stamm *E. coli* Arctic wurden die Kulturen kurz vor der Zugabe von AHT auf 18 °C herunter gekühlt und die Expression erfolgte für 16 Stunden bei 18 °C.

4.6.2 Reinigung von Proteinen mittels *Strep*-Tag Affinitätschromatografie

Die heterolog in *E. coli* produzierten Proteine mit N- oder C-terminalem *Strep*-Tag aus 4.6.1 wurden mittels Affinitätschromatografie an *Strep*-Tactin gereinigt. Hierfür wurden die Zellpellets aufgetaut und in 10 mL Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,5 mM Pefabloc, pH 7,4) aufgenommen und anschließend mittels French Press (French® Pressure Cell Press, American Instrument Company, Division of Travenol Laboratories Inc., Silver Spring, Maryland, USA) bei 16000 Psi aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 4 °C und 31970 x g für 30 Minuten von Zell-Lysat abgetrennt. Dieses wurde anschließend 1:1 mit Säulenpuffer verdünnt und auf eine Tropfsäule, welche 1 mL *Strep*-Tactin (IBA GmbH, Göttingen) enthielt, aufgetragen. Ungewünschte Proteine wurden im Anschluss daran mit 10 Säulenvolumen (SV) Säulenpuffer (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,4) herunter gewaschen. Die Elution der Proteine von der Säule erfolgte mit 5 SV Elutionspuffer (Säulenpuffer + 2,5 mM Desthiobiotin) in 1mL-Fractionen. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit 10 SV Regenerationspuffer (Säulenpuffer + 2,5 mM HABA) regeneriert.

4.6.3 Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatografie an Amylose-Resin

Die heterolog in *E. coli* produzierten Proteine, welche N-terminal mit dem Maltose-Bindeprotein von *E. coli* fusioniert sind, wurden mittels Affinitätschromatografie an Amylose-Resin gereinigt. Der MBP-Tag des Proteins bindet dabei an die Amylose im Säulenmaterial. Die aufgetauten Zellpellets aus 5.3.1 wurden zunächst in 10 mL (bei 500 mL Kultur) oder 20 mL (bei 1 L Kultur)

Resuspensionspuffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,5 mM Pe-fabloc, pH 7,4) resuspendiert und anschließend mittels French Press (French® Pressure Cell Press, American Instrument Company, Division of Travenol Laboratories Inc., Silver Spring, Maryland, USA) bei 16000 Psi aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 4 °C und $31861 \times g$ für 30 Minuten von Zell-Lysat abgetrennt. Dieses wurde anschließend 1:1 mit Säulenpuffer verdünnt und auf eine Tropfsäule, welche 1 mL Amylose-Resin (New England BioLabs GmbH (Ipswich, MA, USA)) enthielt, gegeben. Ungewünschte Proteine wurden im Anschluss daran mit 10 Säulenvolumen (SV) Säulenpuffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,4) herunter gewaschen. Die Elution der MBP-CBS Fusion von der Säule erfolgte mit 5 SV Elutionspuffer (Säulenpuffer + 10 mM Maltose) in 1mL-Fractionen. Die Regeneration des Säulenmaterials erfolgte nach Protokoll des Herstellers (New England Biolabs [Ipswich, MA, USA]). Für die Kontrolle der Reinigung wurden Proben von verschiedenen Schritten der Reinigung für ein SDS Gel genommen.

4.6.4 Größenausschlusschromatografie

Für einen zweiten Reinigungsschritt wurde eine Größenausschlusschromatografie an einer HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Säule mithilfe einer Äkta pure ((beides GE Healthcare Life Science, Amersham, UK) durchgeführt. Für den Lauf wurde die Säule mit 4 SV 50 mM Kaliumphosphatpuffer (KPP), 300 mM NaCl pH 8,0 equilibriert. Es wurden 7-15 mg Protein aus 4.6.3 in einem Volumen von 2 mL aufgetragen. Das Protein wurde in 1 mL Fractionen gesammelt und anschließend mithilfe eines Zentricons mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa (Vivaspin® 6, 20 ml Volumen, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, DE) ankonzentriert.

4.6.5 Konzentrationsbestimmung gereinigter Proteine

Um die Konzentration von gereinigten Proteinen zu bestimmen, wurde am Nano-Drop® - Spektrophotometer (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, DE) die Absorption der Probe bei 280 nm gemessen. Für die Berechnung der Konzentration in mg/mL durch das Gerät wurden zusätzlich die Werte für das Molekulargewicht und den Extinktionskoeffizienten (siehe Tabelle 20) eingegeben.

4.6.6 Proteinbestimmung von Zellextrakten

Die Proteinbestimmung von Zellextrakten erfolgte mittels der Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Hierfür wurden aus den Kulturen für die c-di-AMP Messung jeweils 3 x 1 mL entnommen, zentrifugiert (10 min, $16620 \times g$, 4 °C) und die Zellpellets bei -20 °C gelagert. Für den Zellaufschluss wurden die Proben in 800 µL 0,1 M NaOH aufgenommen, für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, $16620 \times g$, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet ein zweites Mal in NaOH resuspendiert, gekocht und zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt, 1:4 in Wasser verdünnt und in die Proteinbestimmung eingesetzt. Für die Standardkurve wurde BSA mit verschiedenen Konzentrationen verwendet (0, 20, 40, 60, 80 und 100 µg/ml). Die Messung erfolgte in Dreifachbestimmung in einer 96er

Mikrotiterplatte (Sarstedt, Nümbrecht, DE) mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (Synergy H1, BioTek Instruments, Winooski, USA). Als Blindwert wurden 200 μL Wasser verwendet. Von jedem Standard bzw. jeder Probe wurden 20 μL vorgelegt und anschließend 180 μL Roti-Nanoquant (1:5 verdünnt) hinzugegeben. Die Platte wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend die Absorption bei 595 nm gemessen.

4.6.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Kontrolle von Proteinproduktion und Reinigung wurde eine SDS-Gelelektrophorese mit 12 %igen SDS Gelen (Zusammensetzung siehe Tabelle 17) durchgeführt. Alle Puffer dafür sind in Tabelle 16 aufgelistet. Die Proben der heterologen Proteinproduktion (4.6.1) wurden auf eine OD_{578} von 10 in Wasser aufgenommen. Alle Proben wurden mit einem 4x SDS Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (10 min, 16620 $\times g$, RT) und die Proben wurden auf das Gel aufgetragen zusammen mit dem Prestained PageRuler als Größenstandard. Der Lauf erfolgte in 1x Laufpuffer in einer Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad Laboratories Inc. [Hercules, CA, USA]) bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel. Nach dem Lauf wurden die Gele mit destilliertem Wasser abgespült, mit dem Färber „InstantBlue™ Fast Stain“ gefärbt und überschüssige Färbung durch Inkubation in Wasser entfernt.

Tabelle 16: Puffer für SDS-Gele und deren Zusammensetzung.

| Puffer | Zusammensetzung |
|---------------------|---|
| Trenngelpuffer | 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 13,8 mM SDS |
| Sammelgelpuffer | 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 13,8 mM SDS |
| 4x SDS Probenpuffer | 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2,5 % SDS; 0,002 % Brom-phenolblau 0,71 M β -Mercaptoethanol |
| 1x Laufpuffer | 25 mM Tris (pH 8,3), 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS |

Tabelle 17: Herstellung von zwei 12 %igen SDS-Minigelen.

| Komponente | Trenngel | Sammelgel |
|------------------------|------------------|------------------|
| Trenngelpuffer | 2,5 mL | - |
| Sammelgelpuffer | - | 2,5 mL |
| 40 % Acrylamid | 3,0 mL | 0,825 mL |
| H ₂ O | 4,5 mL | 6,675 mL |
| 10 % Ammoniumpersulfat | 40 μL | 40 μL |
| TEMED | 20 μL | 20 μL |

4.6.8 Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS)

Um zu testen, ob c-di-AMP an die CBS Domänen von OpuAA, OpuBA und OpuCA bindet, wurde mit den gereinigten MBP-Fusionsproteinen Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS) durchgeführt. Diese Experimente wurden in Kooperation mit Dr. Wieland Steinchen (AG Bange, Uni Marburg, Fachbereich Chemie) durchgeführt und ausgewertet.

Im Wesentlichen erfolgte die Durchführung der Experimente wie kürzlich beschrieben (Kunz et al., 2020). Zur Messung der c-di-AMP-gebundenen Zustände wurden die jeweiligen Proteine mit c-di-AMP gemischt (Endkonzentration 50 μ M bzw. 1 mM). Für die apo-Zustände wurde zu den jeweiligen Proteinen ein gleiches Volumen H_2O hinzugefügt.

Die weitere Probenvorbereitung erfolgte mittels eines Autosamplers (LEAP Technology, Aabenraa, Dänemark). 7,5 μ L des Proteins (50 μ M) mit oder ohne c-di-AMP wurden mit 67,5 μ L Puffer gemischt, welcher in deuteriertem Wasser als Lösungsmittel hergestellt wurde (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, pH 8.0).

Der Wasserstoff/Deuterium (H/D)-Austausch erfolgte für 10, 30, 95, 1000 und 10000 Sekunden bei 25 °C und wurde anschließend durch Mischen von 55 μ L der Probe mit 55 μ L Quench-Puffer (400 mM KH_2PO_4/H_3PO_4 , 2 M Guanidin-HCl, pH 2,2; vorgekühlt auf 1 °C) gestoppt. 95 μ L der gestoppten Reaktion wurden in ein ACQUITY UPLC M-Class System mit HDX Technologie (Waters) injiziert. Undeuterierte Proben wurden in analoger Weise vorbereitet mittels 10-facher Verdünnung in Puffer mit dem Lösungsmittel H_2O . Proteolytischer Verdau der Proteine erfolgte mittels immobilisiertem Schweinepepsin bei 12 °C und einem konstanten Fluss (100 μ L/min) von H_2O + 0,1 % (v/v) Ameisensäure. Die entstandenen peptischen Peptide wurden auf einer Trap-Säule (2 mm x 2 cm, gefüllt mit POROS 20 R2 Material [Thermo Scientific]; gekühlt auf 0,5 °C) gesammelt.

Nach 3 Minuten wurde die Trap-Säule mit einer ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m 1,0 x 100 mm Säule (Waters) in Reihe geschaltet und die Peptide bei 0,5 °C mittels eines Gradienten von Wasser + 0,1 % (v/v) Ameisensäure (A) und Acetonitril + 0,1 % (v/v) Ameisensäure (B) bei 30 μ L/min Flussrate folgendermaßen eluiert: 0 - 7 min/95 - 65 % A; 7 - 8 min/65 - 15 % A und 8-10 min/15 % A. Die Peptide wurden mittels Elektrospray-Ionisierung (Kapillar-Temperatur 250 °C, Spannung 3,0 kV) ionisiert und Massenspektren wurden über eine Skala von 50 bis 2000 m/z auf einem Synapt G2-Si Massenspektrometer im HDMSE Modus (Proben ohne H/D Austausch) bzw. im HDMS Modus (Proben mit H/D Austausch) akquiriert. Eine kontinuierliche Massenkorrektur erfolgte mittels [Glu1]-Fibrinopeptid B Standard (Waters). Während der Trennung der Peptide wurde die Pepsin-Säule drei Mal mit 80 μ L 4 % (v/v) Acetonitril und 0,5 M Guanidin-Hydrochlorid gewaschen sowie zwischen allen Proben wurden Leerproben (H_2O) injiziert. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

Die Identifikation der Peptide erfolgte mittels ProteinLynx Global SERVER 3.0.1 (PLGS, Waters) wie bereits kürzlich beschrieben (Osorio-Valeriano et al., 2019) von den Peptiden ohne H/D Austausch (im HDMS^E Modus akquiriert). Die Peptide wurden mit einer Datenbank abgeglichen, welche die Sequenz vom jeweiligen Protein, von Pepsin sowie deren umgekehrte Sequenz enthält. Dabei wurden folgende Suchparameter genutzt: Peptid-Toleranz: automatisch; Fragment-Toleranz: automatisch; minimale Fragment-Ionen-Übereinstimmung pro Peptid = 1; minimale Fragment-Ionen-Übereinstimmung pro Protein = 7; minimale Peptid-Übereinstim-

mungen pro Protein = 3; maximale Treffer um zurückzukehren = 20; Maximale Proteinmasse = 250000; Primäre Verdauungs-Reagenz: nicht spezifisch; verpasste Spaltungen = 0 und falsche Entdeckungsrate = 100. Für die Quantifizierung der Deuteriumaufnahme mittels DynamX 3.0 (Waters) mussten die Peptide folgende Kriterien erfüllen: Minimale Intensität: 25000 Counts; eine maximale Länge von 30 Aminosäuren, minimale Anzahl der Produkte pro Aminosäure = 0,2; maximaler Fehler der Masse = 225 ppm und eine Retentionszeit-Toleranz von 0,5 Minuten. Nach automatisierter Datenverarbeitung durch DynamX wurden die Spektren aller Peptide manuell validiert und falls notwendig korrigiert oder im Falle von z. B. niedrigem Signal-Rausch-Verhältnis nicht berücksichtigt. Die Diagramme der H/D Austausch Profile wurden mittels MEM-HDX erstellt (Hourdel et al., 2016).

4.6.9 *MicroScale Thermophoresis (MST)*

Für die Bestimmung der Affinität der CBS Proteine sowie deren Derivate zu c-di-AMP wurde eine *MicroScale Thermophoresis* in Kooperation mit Dr. Sven-Andreas Freibert (AG Lill, Uni Marburg, Fachbereich Medizin) durchgeführt. Diese Methode macht sich das Phänomen zu Nutze, dass Moleküle (u. A. auch Proteine in Lösungen) sich innerhalb eines Temperaturgradienten gerichtet bewegen (Duhr und Braun, 2006; Jerabek-Willemsen et al., 2011). Die gereinigten Proteine (je 20 µM) aus 4.6.4 wurden im bei der Gelfiltration genutzten KPP mit dem Farbstoff NT-647 mittels Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS 2nd Generation (NanoTemper Technologies GmbH, München) entsprechend der Herstellerangaben markiert. Bei der Trennung des markierten Proteins vom freien Fluoreszenzfarbstoff wurde dieses wieder in den Säulenpuffer aus der Affinitätschromatografie (siehe 4.6.3) überführt. Für die Messung wurde eine 16-stufige Verdünnungsreihe von c-di-AMP angelegt (1:1, 750 µM ... 22,888 nM; für CBS-AA 3,75 mM ... 114,441 nM) und das markierte Protein in einer Endkonzentration von 200 nM zu jeder Verdünnung hinzugegeben. Die Messung erfolgte im Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH, München) bei 21 °C und 680 nm. Dabei wurde die LED Power auf 40 % und der Infrarot Laser auf 75 % eingestellt. Jedes Protein wurde mit zwei unabhängigen, biologischen Replikaten und diese jeweils in drei technischen Parallelen vermessen. Die Auswertung erfolgte mittels des vom Hersteller bereitgestellten Programms NanoTemper Analysis 1.2.009 sowie Origin8G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

4.7 Elektronenmikroskopie

Für die Bestimmung des Zytoplasmavolumens von *B. subtilis* wurden verschiedene Mikroskopie Techniken genutzt. Als Bedingungen wurden SMM 0M; SMM + 1 mM Glycinbetain, SMM + 1,2 M NaCl und SMM + 1,2 M NaCl + 1 mM Glycinbetain gewählt. Die Zellen wurden jeweils bis zu einer OD₅₇₈ von 1,5 - 1,7 kultiviert und anschließend für die Mikroskopie vorbereitet.

4.7.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Um das äußere Zellvolumen von *B. subtilis* bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen zu messen, wurde in Kooperation mit Dr. Karl-Heinz Rexer und Petra Horn (ehemals AG Kost, jetzt AG Junker; Uni Marburg) Rasterelektronenmikroskopie (REM) durchgeführt. Es wurden jeweils

500 μL Zellen auf einer Nylonmembran (Pall BioSupport, East Hills, USA) immobilisiert und die mit den Zellen behafteten Membranen über Nacht in einer 1 % Glutaraldehydlösung im jeweiligen Medium inkubiert. Die Membranen wurden am nächsten Tag drei Mal für 10 Minuten mit Sørensen-Puffer (pH 7,8) gewaschen und zum Nachfixieren für zwei Stunden in 1 % wässriger Osmiumlösung (OsO_4) inkubiert. Für die Entfernung des überschüssigen Osmiums erfolgten wiederum Wasch-Schritte für jeweils 10 Minuten, zunächst drei Mal in Sørensen-Puffer, dann drei Mal in dH_2O . Anschließend wurden die Zellen mittels einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert: Inkubation jeweils 10 Minuten in 30 %, 50 %, 70 % und 95 % Aceton und am Ende drei Mal 10 Minuten in 100 % Aceton. Daraufhin erfolgte die Kritische-Punkt-Trocknung mittels Polaron E 3000 nach den Angaben des Herstellers (Thermo VG Scientific, East Grinstead, UK). Nachfolgend wurden die Zellen mittels Balzers Sputter Coater (Balzers, Liechtenstein) mit Gold besputtert. Die Rasterelektronenmikroskopie erfolgte mittels des Hitachi S 530 Mikroskops (Hitachi, Tokio, Japan). Die Länge und Breite der Zellen wurde anschließend mit dem Programm ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) vermessen.

4.7.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Um die Dicke der Zellwände von *B. subtilis* bei unterschiedlichen Bedingungen zu messen, wurde in Kooperation mit Dr. Thomas Heimerl (AG Maier, Uni Marburg) Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt. Hierfür wurden 500 μL Zellen genommen und für 5 Minuten und $2000 \times g$ zentrifugiert. Die Pellets wurden in 30 μL 1 % Glutaraldehyd (v/v) im jeweiligen Medium aufgenommen und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen bei hohem Druck (circa 200 bar) in flüssigem Stickstoff eingefroren (englisch: **high pressure freezing**, HPF) mittels HPF Compact 02 (Wohlwend, Schweiz). Um das intrazelluläre Wasser durch organische Lösungsmittel auszutauschen, erfolgte danach eine Gefriersubstitution im Gerät AFS2 (Leica, Wetzlar, DE). Hierfür wurden die gefrorenen Zellsuspensionen nach dem folgenden Protokoll im Substitutionsmedium (Aceton, 0,25 % Osmium(VIII)-oxid, 0,2 % Uranylacetat und 5 % ddH_2O) inkubiert: -90°C für 20 h, -90°C bis -60°C in 1 h, -60°C für 8 h, -60°C bis -30°C in 1 h, -30°C für 8 h und -30°C bis 0°C in 1 h. Bei 0°C wurden die Proben drei Mal in Aceton gewaschen. Anschließend erfolgte die Einbettung im Kunstharz Epon. Hierfür wurde eine 1:1 Mischung aus Aceton und Epon 812 Resin (Fluka, Buchs, Schweiz) verwendet und die Proben für zwei Stunden inkubiert. Die 1:1 Mischung wurde gegen pures Epon ausgetauscht um die Proben über Nacht zu imprägnieren. Nach einem zweiten Austausch mit Epon wurden die Proben für zwei Tage bei 60°C polymerisiert. Die auspolymerisierten Blöcke wurden mittels Rasierklinge getrimmt und in 50 nm dünne Sektionen geschnitten mittels Ultramikrotom (UC7, Leica, Wetzlar, DE) und daran befestigten Diamantklingen (Diatome, Biel, Schweiz). Die Schnitte wurden auf Slot-Grids aus Kupfer aufgetragen, welche anschließend in Pioloform eingelegt wurden. Für zusätzlichen Kontrast wurden die Schnitte zunächst für 20 - 30 Minuten in 2 % Uranylacetat und anschließend für 1 - 2 Min in Bleicitrat nachgefärbt. Die Visualisierung und Analyse der Schnitte erfolgte mittels eines JEM-2100 Transmissionselektronenmikroskop (JEOL, Tokyo, Japan) ausgestattet mit einer $2k \times 2k$ F214 FastScan CCD Kamera (TVIPS, Gauting, DE). Die Zellwände wurden anschließend mit dem Programm ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) vermessen.

4.8 Bioinformatische Methoden

Die Alignments von Proteinsequenzen wurden mithilfe des MAFFT Online-Servers erstellt (Kato et al., 2017). Die Darstellung erfolgte durch Jalview 2.11.1.0 (<http://www.jalview.org/>; Waterhouse et al., 2009). Sequenzidentitäten wurden mittels Clustal Omega 2.1 berechnet (McWilliam et al., 2013; <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Die *in silico* Modelle der CBS Domänen der Opu Transporter von *B. subtilis* wurden durch den Online-Server SwissModel erstellt (Waterhouse et al., 2018; <https://swissmodel.expasy.org/>). Dabei wurden die CBS Sequenzen (siehe Abb. 9) als Template genutzt und das Modell mit dem ersten Treffer in der Ergebnisliste erstellt. Die Darstellung der Modelle, Overlays und Analyse der Mutationen erfolgte mittels Chimera 1.14 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>; Pettersen et al., 2004). Als Vergleich zur Erstellung von Homologie-Modellen wurde Phyre² (Kelley et al., 2015; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) genutzt.

5 Ergebnisse

5.1 Struktur-Modelle der *B. subtilis* OpuAA, OpuBA und OpuCA CBS Domänen

Um die CBS Domänen der *B. subtilis* Transporter OpuA, OpuB und OpuC zu analysieren, wurde in einem ersten Schritt dieser Arbeit nach homologen Strukturen gesucht. Zu diesem Zeitpunkt gab es zwei homologe CBS Domänen von Opu Transportern, die bereits untersucht und auch kristallisiert waren: Zum einen die von OpuCA aus *L. monocytogenes* (Huynh et al., 2016b) und zum anderen die von OpuCA aus *S. aureus* (Schuster et al., 2016). Zur Vereinfachung werden die CBS Domänen von *B. subtilis* als auch die der anderen Bakterien von hier an als CBS-AA, CBS-BA und CBS-CA bezeichnet. Um herauszufinden ob es möglicherweise noch andere homologe Proteine gibt, wurden Homologie-Modelle mit zwei verschiedenen Online Servern erstellt. Nutzt man den Online Server SwissModel für die Erstellung von Homologie-Modellen und gibt als Zielsequenz die Sequenzen von CBS-AA, BA bzw. CA ein, wird bei allen drei Sequenzen ein Modell basierend auf der Struktur von *L. monocytogenes* (*Lm*) (PDB: 5KS7) erstellt. Sucht man allgemein nach homologen Strukturen (ohne direkt ein Modell zu bauen), erscheint in der Liste nach *Lm* CBS-CA bei CBS-BA und CBS-CA direkt die Struktur von *S. aureus* (*Sa*) (PDB: 5IIP), wohingegen bei CBS-AA auf *Lm* CBS-CA erst ein hypothetisches Protein (29PM) und drei Magnesiumtransporter (2YVX, 2ZY9 und 2OUX) folgen. In der Ergebnisliste sind die Templates nach ihrer Qualität sortiert, die in Form des GMQE-Werts (Global Model Quality Estimate) ausgedrückt wird. Für den GMQE-Wert werden verschiedene Eigenschaften des Zielsequenz-Template Alignments (u. A. Sequenzidentität, Sequenzähnlichkeit, Übereinstimmung der Sekundärstruktur von Zielsequenz und Template) ausgewertet (Waterhouse et al., 2018; Biasini et al., 2014).

Eine Alternative zu SwissModel stellt Phyre² (**P**rotein **H**omology/analog**Y** **R**ecognition **E**ngine) dar. Damit kann man ebenfalls Homologie-Modelle anhand einer Zielsequenz erstellen lassen. Interessanterweise unterscheiden sich die Ergebnisse für alle drei CBS Domänen grundlegend von denen bei SwissModel (siehe Tab. 18). Zunächst erscheint bei keiner der drei Zielsequenzen *Lm* CBS-CA als erstes Ergebnis. Bei CBS-AA ist *Lm* CBS-CA erst an Position 34 während *Sa* CBS-CA sogar das zweite Ergebnis ist. Für CBS-BA und -CA ist das hingegen ungefähr umgekehrt. Insgesamt sind die Ergebnisse für CBS-BA und CBS-CA relativ ähnlich. Das ist damit zu erklären, dass die Transporter OpuB und OpuC wahrscheinlich durch eine Genduplikation entstanden sind (Kappes et al., 1999). Die Sequenzidentität ist sowohl für die Substratbindeteine (71 %), die Transmembrandomänen (85 %) als auch für die Nukleotidbindedomänen (84 %) und somit auch die CBS Domänen mit 69,1 % sehr hoch.

In der Liste insgesamt fällt auf, dass die ersten Ergebnisse, welche ähnlich wie bei SwissModel nach Qualität des Alignments sortiert sind, nicht unbedingt die höchste Sequenzidentität zu den Zielsequenzen haben. Diese Werte liegen meist zwischen 20 und 30 %. Die einzigen Strukturen mit höherer Identität sind *Lm* CBS-CA und *Sa* CBS-CA für alle drei CBS Domänen. Das ist damit zu erklären, dass eine CBS Domäne sich durch ihre Struktur definiert und nicht durch eine bestimmte Aminosäuresequenz. Aus diesem Grund erscheinen in der Liste auch CBS Domänen aus weiter entfernten Organismen wie Archaeen, Pilzen und dem Menschen. Neben den CBS Domänen der Opu Transporter taucht in den Listen von SwissModel

und Phyre² der Magnesium Transporter MgtE häufiger auf, bei den ersten Treffern aus *Enterococcus faecalis* und *Thermus thermophilus*. Dieser Transporter ist konstitutiv aktiv, bildet ein Dimer und enthält ebenfalls im zytosolischen Teil pro Monomer zwei CBS Domänen, welche vermutlich eine regulatorische Funktion haben (Hattori et al., 2007; Ragumani et al., 2010). Interessanterweise konnte kürzlich mittels DRaCALA Assay auch eine Bindung von c-di-AMP an MgtE aus *B. subtilis* detektiert werden (Gundlach et al., 2019). Insgesamt sind durch die Suche keine weiteren Strukturen aufgetaucht, die für die Untersuchung der Opu CBS Domänen aus *B. subtilis* interessant sind.

Tabelle 18: Ergebnisse der Suche nach homologen Strukturen zu den *B. subtilis* Opu CBS Domänen durch den Online Server Phyre². Aufgelistet sind jeweils die ersten drei Ergebnisse der Suche sowie die Positionen von *L. monocytogenes* (*Lm*) CBS-CA und *S. aureus* (*Sa*) CBS-CA in der Liste.

| Zielsequenz | Ergebnis 1-3 | Position <i>Lm</i> CBS-CA | Position <i>Sa</i> CBS-CA |
|---------------|--|------------------------------|------------------------------|
| CBS-AA | 1. 4L3V: humanes CBS-Protein 2. 5IIP: <i>Sa</i> OpuCA 3. 4Z87: Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (<i>Ashbya gossypii</i>) | 34 | 2 |
| CBS-BA | 1. 2YVX: Mg ⁺ -Transporter MgtE (<i>Thermus thermophilus</i>) 2. 3DDJ: CBS-Domäne enthaltendes Protein (<i>Sulfolobus solfataricus</i>) 3. 2OUX: Mg ⁺ -Transporter (<i>Enterococcus faecalis</i>) | 4 | 32 |
| CBS-CA | 1. 3DDJ: CBS-Domäne enthaltendes Protein (<i>Sulfolobus solfataricus</i>) 2. 2OUX: Mg ⁺ -Transporter (<i>Enterococcus faecalis</i>) 3. 4Z87: Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (<i>Ashbya gossypii</i>) | 5 | 45 |

5.2 Sequenzanalyse der Opu CBS Domänen von *B. subtilis*, *L. monocytogenes* und *S. aureus*

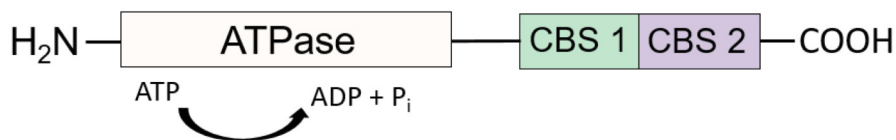
Obwohl eine CBS Domäne sich durch ihre Tertiärstruktur auszeichnet, spielt die Aminosäuresequenz später für die biochemische Charakterisierung eine wesentliche Rolle. Schaut man sich die Sequenzidentitäten der CBS Domänen aus *B. subtilis*, *L. monocytogenes* und *S. aureus* an, fallen folgende Punkte auf (siehe Tab. 19): Zunächst weist *Bs* CBS-AA zu allen anderen Sequenzen ähnliche Identitäten um die 20 % auf. Hingegen sind sie für *Bs* CBS-BA und CA wesentlich höher: Diese sind jeweils mit *Lm* CBS-CA zu 56,4 bzw 57,9 % mit *Sa* CBS-CA zu 42,4 bzw 46,4 % identisch.

Tabelle 19: Sequenzidentitäts-Matrix der CBS Domänen von *B. subtilis* (Bs), *L. monocytogenes* (Lm) und *S. aureus* (Sa). Die Berechnung erfolgte mittels Clustal Omega 2.1.

| | Bs CBS-AA | Bs CBS-BA | Bs CBS-CA | Lm CBS-CA | Sa CBS-CA |
|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Bs CBS-AA | 100 % | 21,7 % | 22,5 % | 23,1 % | 20,9 % |
| Bs CBS-BA | 21,7 % | 100 % | 69,1 % | 56,4 % | 42,4 % |
| Bs CBS-CA | 22,5 % | 69,1 % | 100 % | 57,9 % | 46,4 % |
| Lm CBS-CA | 23,1 % | 56,4 % | 57,9 % | 100 % | 40,1 % |
| Sa CBS-CA | 20,9 % | 42,4 % | 46,4 % | 40,1 % | 100 % |

Bei einem Alignment der Sequenzen (siehe Abb. 9) fällt auf, dass einige Aminosäuren in allen 5 Proteinen vorkommen. Daneben gibt es einige Aminosäuren, die außer in *Bs* CBS-AA in allen anderen Proteinen vorkommen, was die höhere Sequenzidentität widerspiegelt. Für die weitere Arbeit, vor allem später für die Analyse der Aminosäuren, die an der Bindung zu c-di-AMP beteiligt sind, wurde entschieden, die Struktur von *Lm* CBS-CA als Vorlage zu nutzen.

A



B

| | | | |
|-----------|----|---|-----|
| Bs-CBS-AA | 1 | M·KRAETVRIDKGRVALTLTKNLGISSIYADKQKKLLGVYASDAKKAESDLSLQDILNTEFTTPENTYITEIF | 77 |
| Bs-CBS-BA | 1 | MNTQPVITADKTLSEAIQLMRQERVDLSLLVNDERVLQCYVDVEIIDQCRKKANLVSEVLHEDIYTVLGGTLRDTV | 78 |
| Bs-CBS-CA | 1 | MNRTPTVSADKTLSQLQLMRKRVDSLLVDRQNVLKGYYDVEMIDQNRKKASIVGDVYRSDIYTVQKGALLRDTV | 78 |
| Lm-CBS-CA | 1 | MNTNPVSIADKSLQAAITVMKEKRVDTLLVDEGNVLKGFIDVEQIDLNRRTATSVMDIEKNVFYVYEDTLRDTV | 78 |
| Sa-CBS-CA | 1 | M·IKPITIQAQATLNDVHIMRQKRVDTIFVVDNNHLLGFLDIEDINQGI RGHKSLRDTMQQHIYTVQIDSKLQDSV | 77 |
| Bs-CBS-AA | 78 | DVVSDANIP·IAVVDKQRMKSIIVVFGALIGAL·AGNNEYINAEGTNEQTQDPSAQE·VK· | 134 |
| Bs-CBS-BA | 79 | RKILKRGVKYVPVDEDRRLISIVTRASLVDIVYDSLWG·EEKQLAAL·S | 126 |
| Bs-CBS-CA | 79 | RKILKQGIKYVPVDEQNHLAGIVTRASLVDIVYDSIWGDEENQLMTI· | 126 |
| Lm-CBS-CA | 79 | QRILKRGYKIPVVDKDKRLVSIIVTRASLVDIVYDSIWGTLEDATENQ·EEQADSKTTE·PEMK·QEG | 143 |
| Sa-CBS-CA | 78 | RTILKRVNRNVPVDDQQLVGLITRANVVDIVYDTIWGDSQEDTVQTEHVGEDTASSKVHEQHTTNVKVRDIDGDDKS | 154 |

Abbildung 9: Sequenzalignment der CBS Domänen der Opu Transporter von *B. subtilis*, *L. monocytogenes* und *S. aureus*. (A) Schematische Darstellung der Nukleotidbindedomäne eines Monomers der Opu Transporter. Am C-Terminus des Proteins befinden sich die CBS Domänen 1 und 2. (B) Sequenz-Alignment der CBS-Domänen. CBS1 und 2 aus (A) sind grün bzw. violett hinterlegt.

5.3 Strukturelle Analyse der CBS Domänen der Opu Transporter aus *B. subtilis*

Für die CBS-Domäne von OpuCA aus *L. monocytogenes* konnte gezeigt werden, dass diese den Second Messenger c-di-AMP bindet. Im Zusammenhang mit diesen Experimenten erhielt man auch eine Kristallstruktur der CBS Domäne in Gegenwart von c-di-AMP (PDB: 5KS7; Huynh et al., 2016b), allerdings ohne ATPase Domäne. Diese zeigt, wie die CBS-Domänen der beiden Monomere der Nukleotidbindedomänen (NBD) dimerisieren (siehe Abb. 10). Jede NBD hat CBS1 und 2, damit hat das Dimer insgesamt vier CBS Domänen. Ein interessanter Fakt ist, dass die CBS Domänen der beiden Monomere entgegengesetzt orientiert sind. Das

wirft die Frage auf, wie die ATPasen am jeweiligen N-Terminus orientiert sind, da diese um den Transport zu ermöglichen zusammen agieren. CBS-CA von *S. aureus* konnte auch kristallisiert werden, allerdings auch ohne die ATPase Domäne und ohne c-di-AMP (Schuster et al., 2016).

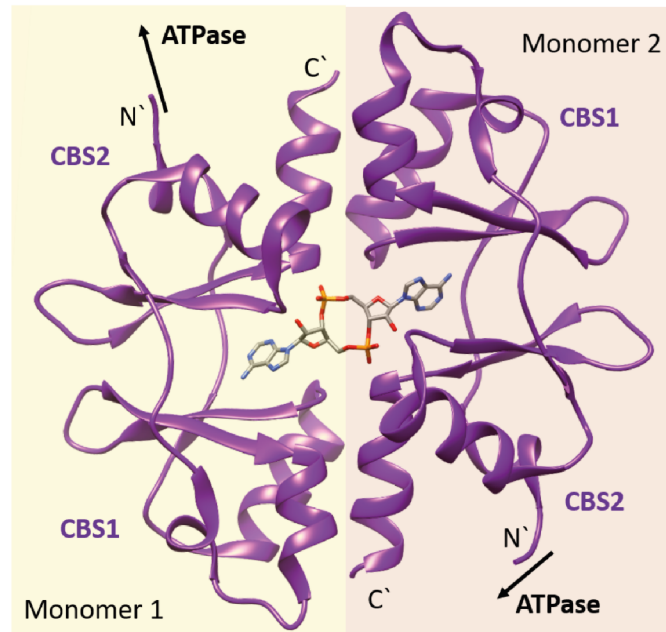


Abbildung 10: Struktur der CBS Domänen der NBD OpuCA aus *L. monocytogenes* mit dem Liganden c-di-AMP. Insgesamt besteht die Struktur aus vier einzelnen CBS Domänen. Jede Nukleotidbindedomäne (gelb und orange hinterlegt) hat CBS1 und 2. Bei der Bindung von c-di-AMP kommt es zur Dimerisierung der beiden Monomere. N' = N-Terminus, C' = C-Terminus. Struktur von PDB 5KS7 bearbeitet.

Da es für die *B. subtilis* CBS Domänen keine Kristallstruktur gibt, wurden Homologie Modelle basierend auf der *Lm* CBS-CA Kristallstruktur erstellt (siehe Abb. 11). Die jeweiligen Overlays aus *Lm* CBS-CA und einer *B. subtilis* CBS Domäne zeigen, dass Modell und Template bei allen drei Proteinen ziemlich ähnlich sind. Allerdings gibt es mehr Unterschiede bei *Bs* CBS-AA, da vor allem in den Linker Regionen, weniger bei Helizes oder β -Faltblättern.

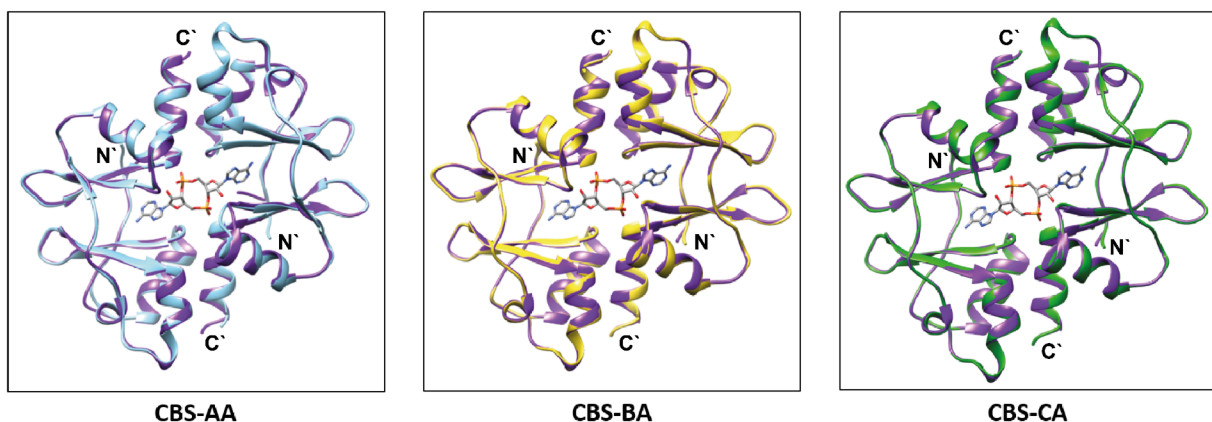


Abbildung 11: Overlay der drei *B. subtilis* CBS Modelle mit der Struktur von CBS-CA von *L. monocytogenes* [violett, PDB: 5KS7]. *B. subtilis* Modelle wurden mithilfe von SwissModel erstellt, wobei die *L. monocytogenes* Struktur als Template diente. Die Erstellung der Overlays erfolgte mittels Chimera. N' = N-Terminus, C' = C-Terminus.

Von dieser Analyse her ist es möglich, dass analog zu *Lm* CBS-CA und *Sa* CBS-CA alle drei CBS Domänen der *B. subtilis* Opu Transporter den Second Messenger c-di-AMP binden. Um diese Frage beantworten zu können, wurde im nächsten Schritt dieser Arbeit an der Produktion und Reinigung der Proteine gearbeitet.

5.4 Biochemische Charakterisierung der CBS Domänen

Um zu analysieren ob c-di-AMP auch an die CBS-AA, BA und CA von *B. subtilis* bindet, wurde zunächst nach einem passenden Expressionssystem für die Proteine gesucht. Zum einen muss die Reinigung mittels Affinitätschromatografie möglich sein und zum anderen sollten die gereinigten Proteine am Ende in ausreichender Konzentration in Lösung vorhanden sein. Zu diesem Zweck wurden zunächst verschiedene Expressionssysteme, Stämme, Produktions- und Reinigungsbedingungen getestet.

5.4.1 Heterologe Produktion und Reinigung der Proteine

Zunächst erfolgte die Klonierung sowohl der kompletten Gene *opuAA*, *opuBA* und *opuCA* als auch der am 3'Ende liegenden CBS-Domänen in die Vektoren pasG-IBA-3 und pasG-IBA-5. In diesen Vektoren wird die Expression der gewünschten Gene durch einen *tet*-Promotor mit dem Repressor TetR reguliert. Für die Reinigung der resultierenden Proteine kodieren die beiden Vektoren zusätzlich für einen *Strep*-Tag, welcher durch pasG-IBA3 C-terminal und durch pasG-IBA5 N-terminal an das Protein angefügt wird. Die erste Testexpression erfolgte in MMA in *E. coli* BL21(DE3) bei 37 °C. Die Expression der Gene erfolgte bei einer OD₅₇₈ von rund 0,5 mit AHT für ungefähr zwei Stunden. Um zu testen ob die Proteine löslich sind, erfolgte der Zellaufschluss mittels French Press. Als von der *Strep*-Tactin Säule kein lösliches Protein eluiert werden konnte, zeigte ein anschließendes SDS Gel, dass das gesamte Protein statt im Überstand zusammen mit den Zelltrümmern im Pellet des Zellaufschlusses vorhanden war. Das galt sowohl für die kompletten NBD als auch für die CBS Domänen.

Um eine langsamere und damit bessere Faltung der Proteine zu ermöglichen, erfolgte in einem zweiten Versuch die Expression bei niedrigeren Temperaturen von 28 °C und 18 °C. Da dies auch nicht zu löslichen Proteinen führte, wurde statt dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) der Stamm ArcticExpress(DE3) RIL verwendet, welcher zusätzlich ein Plasmid enthält, auf dem spezielle Chaperone kodiert sind, welche die Faltung von Proteinen bei geringeren Temperaturen verbessern. Auch dieser Versuch war nicht erfolgreich, ähnlich wie der Test von verschiedenen Pufferkomponenten (Kaliumphosphat, HEPES) bei der Reinigung. Selbst die Puffer, welche für die homologen CBS Domänen für *L. monocytogenes* und *S. aureus* verwendet wurden, führten nicht zum Erfolg. Somit wurde entschieden, ein anderes Expressionssystem zu wählen.

Da es keine Probleme mit der Produktion an sich, jedoch mit der Löslichkeit gab, wurde als alternativer Vektor pMal-c2 gewählt. Auf pMal-c2 ist neben dem IPTG-induzierbarem *tac*-Promotor noch das Maltosebindepotein MalE des Maltoseimporters aus *E. coli* kodiert, welches die Löslichkeit vieler rekombinant produzierter Proteine erhöht (Kapust und Waugh, 1999). Somit sind am Ende 6 Plasmide entstanden, zum einen jeweils mit den ATPasen OpuAA, OpuBA und OpuCA und zum anderen mit den CBS Domänen CBS-AA, CBS-BA und CBS-CA. Diese Varianten erwiesen sich teilweise als erfolgreich: Zunächst ließen sich alle sechs Proteine problemlos produzieren (siehe Abb. 12).

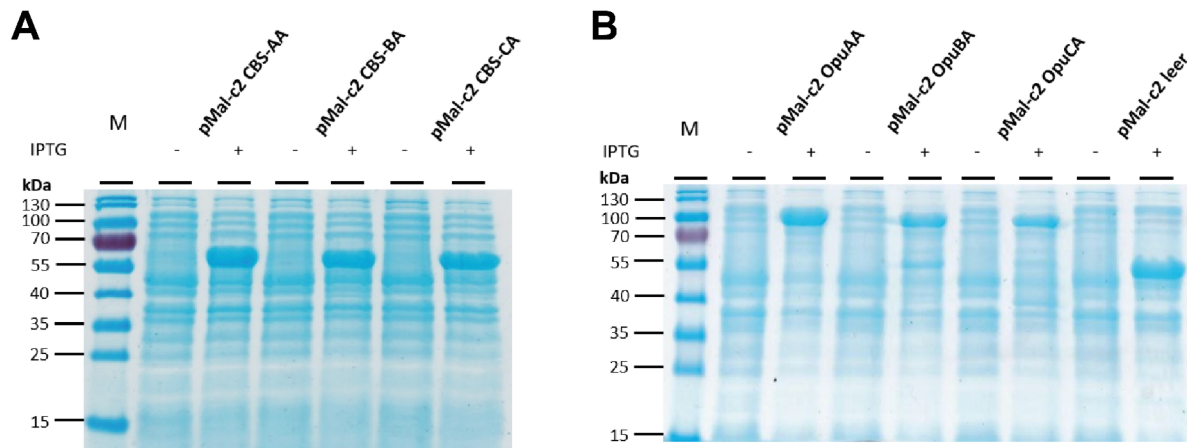


Abbildung 12: Heterologe Produktion der CBS Domänen und NBD der *B. subtilis* Opu Transporter in *E. coli* BL21(DE3). (A) 15 % SDS Gel der heterologen Produktion von CBS-AA, CBS-BA und CBS-CA im Vektor pMal-c2. Die Kultivierung erfolgte in MMA mit Induktion für zwei Stunden mit 0,5 mM IPTG bei einer OD₅₇₈ von 0,5. Erwartete Größe der Fusionsproteine: 57 kDa. (B) 15 % SDS Gel der heterologen Produktion der kompletten NBD von OpuA, OpuB und OpuC sowie von MalE des Leervektors pMal-c2. Produktion analog zu (A). Erwartete Größe der Fusionsproteine: OpuAA: 89 kDa, OpuBA und OpuCA: 86 kDa.

Bei der anschließenden Reinigung der CBS-Domänen konnten 5 - 10 mg Fusionsprotein aus 0,5 Liter Kultur von der Amylose-Säule eluiert werden. Auch die NBD waren löslich und konnten gereinigt werden. Die Reinigungen von OpuAA und CBS-CA sind in Abbildung 13 gezeigt. Letzteres wurde für weitere Experimente zusätzlich per Gelfiltration gereinigt. Für die NBD OpuBA und OpuCA allerdings zeigten die SDS Gele deutlich einen Abbau des Fusionsproteins bei den Fraktionen der Elution trotz der Reinigung bei 5-10 °C sowie der Nutzung von Pfabloc und EDTA um Protease-Aktivität zu verhindern.

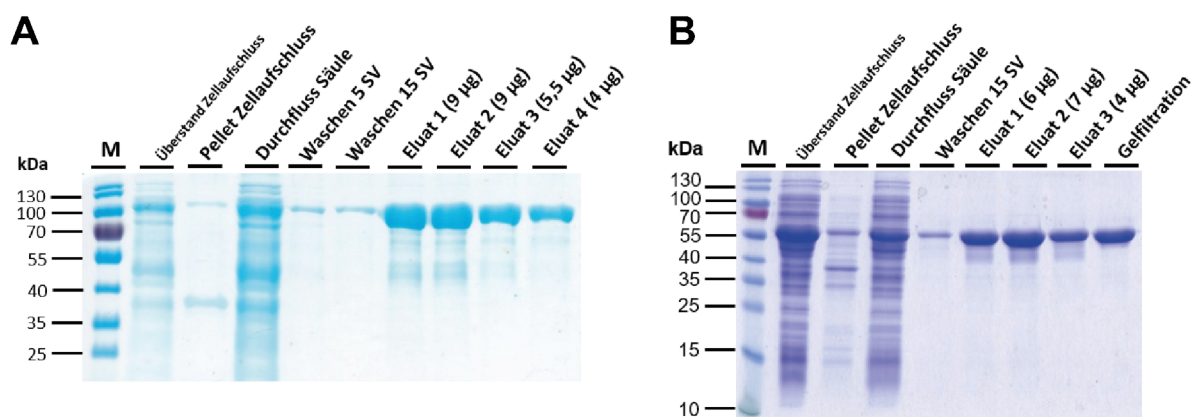


Abbildung 13: Reinigung der Fusionsproteine MalE-OpuAA und MalE-CBS-CA. (A) 13,5 % SDS Gel der Reinigung von MalE-OpuAA. Zellaufschluss erfolgte mittels French Press, anschließend Reinigung an Amylose-Resin. Elution des Proteins mit 10 mM Maltose. (B) 15 % SDS Gel der Reinigung von MalE-CBS-CA. Durchführung analog zu (A). Zusätzlicher Reinigungsschritt mittels Gelfiltration (Spur 9). SV = Säulenvolumen.

Da die Bindung von c-di-AMP an die CBS Domänen charakterisiert werden soll, wurden die Konstrukte MalE-CBS-AA, MalE-CBS-BA und MalE-CBS-CA für die folgenden Schritte verwendet. Die theoretischen Werte für das Molekulargewicht und den Extinktionskoeffizienten, welche für die Bestimmung der Proteinkonzentration am Nano-Drop® - Spektrophotometer (siehe 4.6.5) verwendet wurden, sind in Tabelle 20 gezeigt. Die Berechnung der Werte erfolgte mit dem Tool ProtParam von Expasy (<https://web.expasy.org/protparam>).

Tabelle 20: Theoretische Werte für Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient für die MalE-CBS Fusionsproteine.

| Protein | Molekulargewicht (kDa) | Extinktionskoeffizient ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$) |
|-------------|------------------------|---|
| MalE-CBS-AA | 57,6 | 72310 |
| MalE-CBS-BA | 57,35 | 77810 |
| MalE-CBS-CA | 57,38 | 79300 |

5.4.2 Bindet c-di-AMP an die CBS Domänen der drei Opu-Transporter?

- Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS)

Ob c-di-AMP an CBS-AA, CBS-BA und CBS-CA bindet, wurde zunächst mittels Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (englisch: Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry [HDX-MS]) in Kooperation mit Dr. Wieland Steinchen (AG Bange, Uni Marburg, Fachbereich Chemie) getestet. Dabei wurden die gereinigten MalE-Fusionsproteine genutzt, allerdings nur die CBS Domänen analysiert. Die Experimente wurden für alle drei Proteine sowohl ohne als auch in Gegenwart von c-di-AMP durchgeführt. Sollte c-di-AMP an eines der Proteine binden, ändert sich die Zugänglichkeit für Deuterium an diversen Stellen des Proteins. Der Einbau von Deuterium (= schwerer Wasserstoff) in die Proteine erhöht deren molekulare Masse. Aus diesem Grund kann durch einen anschließenden tryptischen Verdau der Proteine und Analyse der resultierenden Peptide per Massenspektrometrie einerseits festgestellt werden, ob es Unterschiede im Deuterium-Einbau gibt und andererseits, welche Peptide betroffen sind. Für CBS-BA und -CA konnte gezeigt werden, dass es in den beiden Läufen deutliche Unterschiede in der Aufnahme von Deuterium gibt und damit c-di-AMP an die beiden Proteine bindet. Das Resultat des HDX für apo-CBS-BA und mit c-di-AMP (A) sowie die Differenz der beiden Zustände (B) ist in Abb. 14 gezeigt (CBS-CA: siehe Anhang Abb. 40).

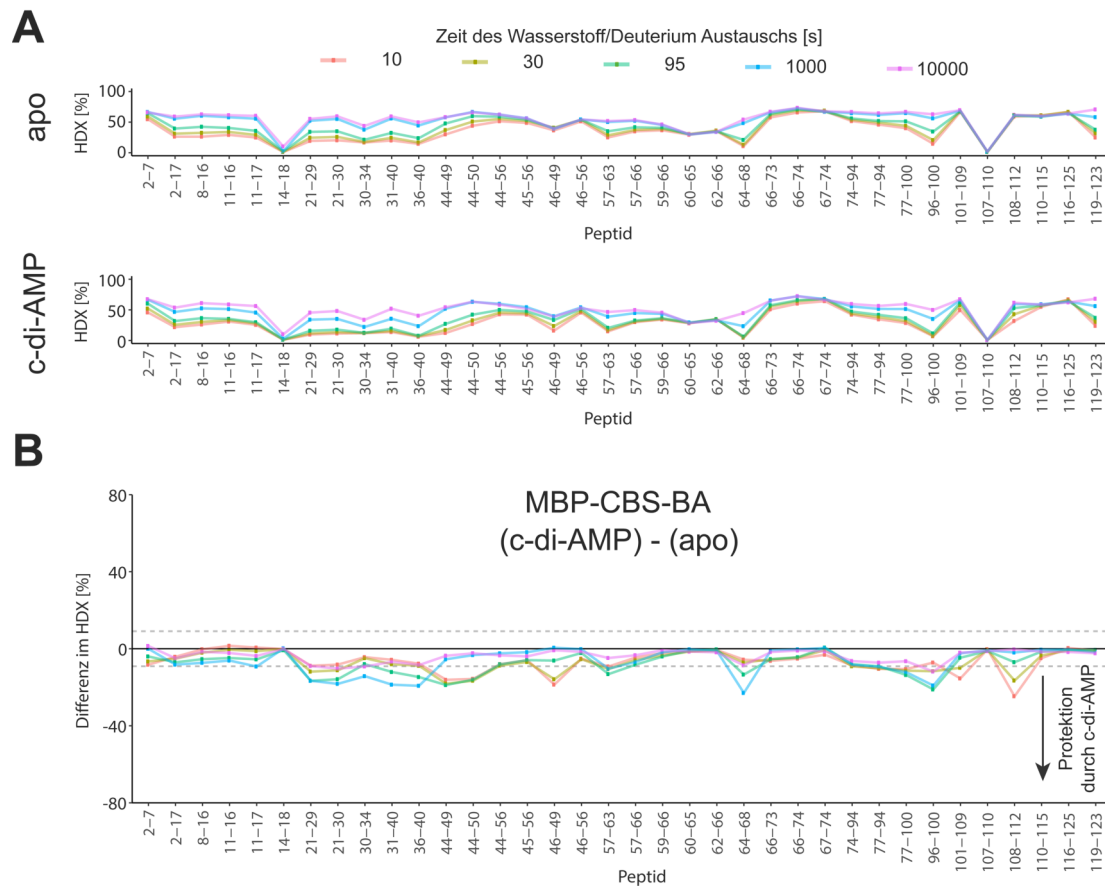


Abbildung 14: Konformationsänderungen durch die Bindung von c-di-AMP an die CBS Domäne von Opu-BA. (A) Relative Wasserstoff/Deuterium (H/D) Austauschprofile des apo- (oben) und des c-di-AMP gebundenen (unten) Zustandes von CBS-BA. **(B)** Konformationsänderungen von CBS-BA ausgedrückt als Differenz der H/D Austauschprofile zwischen dem c-di-AMP gebundenen und dem apo-Zustand. Abbildung modifiziert nach Dr. Wieland Steinchen.

Darüber hinaus wurde in den HDX Experimenten ersichtlich, dass es Änderungen in der Deuteriumaufnahme nicht nur speziell im Bereich der vermuteten Bindetasche von c-di-AMP gibt, sondern auch an den Helizes, wo die beiden CBS-Monomere der beiden ATPasen dimerisieren (siehe Abb. 15). Des Weiteren zeigte das Experiment, dass sich bei CBS-CA die Deuteriumaufnahme mit c-di-AMP deutlich mehr verändert. Zu diesem Zeitpunkt wurde davon ausgegangen, dass es laut Ergebnis von HDX-MS Unterschiede in der Bindungsaffinität von c-di-AMP an CBS-BA und CBS-CA geben müsste.

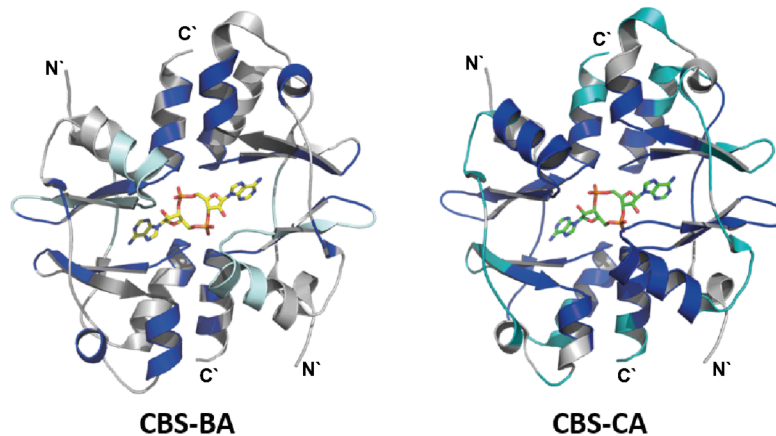


Abbildung 15: Änderungen im HDX zwischen apo- und c-di-AMP gebundenen Zustand für CBS-BA und -CA anhand der Struktur von *L. monocytogenes*. Bereiche ohne Unterschiede sind in grau, mit geringen Unterschieden in hellblau bzw. cyan und mit großen Unterschieden im HDX in dunkelblau gezeigt. N' = N-Terminus, C' = C-Terminus. Abbildung modifiziert nach Dr. Wieland Steinchen.

Für die CBS-AA hingegen konnte keine Bindung von c-di-AMP gezeigt werden, da sich die Deuteriumaufnahme in den beiden Durchläufen kaum veränderte (siehe Anhang Abb. 41). Um die Bindung von c-di-AMP an die CBS Domänen weiter zu charakterisieren, wurden in den folgenden Experimenten Affinitätsstudien durchgeführt.

5.4.3 *MicroScale Thermophoresis* zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten der Wildtyp-Proteine

Um sowohl die Bindungsaffinität von c-di-AMP an die CBS Domänen zu bestimmen wurde eine *MicroScale Thermophoresis* in Kooperation mit Dr. Sven-Andreas Freibert (AG Lill, Uni Marburg, Fachbereich Medizin) durchgeführt. Die Proteine wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff an einem der Lysine markiert. Durch Anschalten eines Infrarotlasers kommt es zu einer gerichteten Bewegung des Proteins und damit zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Zunehmende c-di-AMP Konzentrationen führen im Falle einer Bindung zu einer Veränderung der Bewegung. Diese Veränderungen in Abhängigkeit von der c-di-AMP Konzentration führen am Ende zu einer sigmoidalen Kurve, aus deren Wendepunkt die Dissoziationskonstante ($= K_D$) bzw. Affinität des Proteins zu c-di-AMP bestimmt werden kann.

Zunächst konnte bestätigt werden, dass c-di-AMP nicht an die CBS-AA bindet. Selbst durch Übersättigung des Proteins mit 3,75 mM c-di-AMP war keine Bindung sichtbar. Hingegen konnten für CBS-BA und CBS-CA K_D Werte von $14,99 \pm 1,9 \mu\text{M}$ (BA) bzw. $7,79 \pm 1,1 \mu\text{M}$ (CA) bestimmt werden. In den homologen OpuC Systemen von *L. monocytogenes* und *S. aureus* wurden für die CBS Domänen Affinitäten von $4,8 \mu\text{M}$ bzw. $2,86 \mu\text{M}$ gemessen (Huynh et al., 2016b; Schuster et al., 2016). Diese Ergebnisse stimmen ziemlich gut mit denen dieser Arbeit überein, obwohl sich die jeweiligen Transporter in unterschiedlichen Organismen befinden. Zusätzlich wurde auch die Vermutung aus den HDX-MS Experimenten bestätigt, dass CBS-CA eine höhere Affinität zu c-di-AMP hat als CBS-BA, wobei der Unterschied nicht besonders groß ist. Allerdings ist dieses Phänomen aus Sicht der Struktur der CBS Domänen nicht zu erklären, da es keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Proteinen gibt, wenn man die Aminosäuresequenz und die vorangegangene Modellierungsstudie zu Grunde legt.

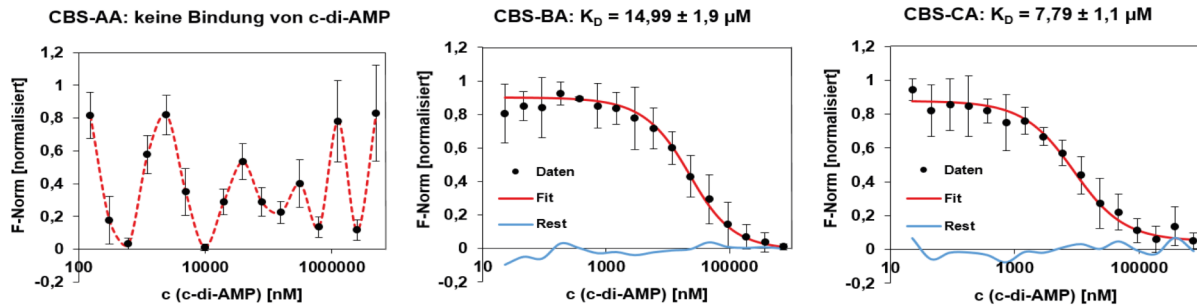


Abbildung 16: Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) für die CBS Domänen der *B. subtilis* Opu Transporter. Jedes Protein wurde als MalE Fusion zwei Mal in der Thermophorese vermessen. Als höchste c-di-AMP Konzentration wurde für CBS-AA 3,75 mM und für CBS-BA bzw. CA 750 µM eingesetzt. Standardabweichung von 2 biologischen Parallelen. „Rest“ stellt dar, wie weit die einzelnen Punkte vom Fit (rot) abweichen. Abbildung modifiziert nach Dr. Sven-Andreas Freibert.

Da alle diese Messungen mit den MalE Fusionen aus *E. coli* durchgeführt wurden, wurde eine Kontrolle mit gereinigtem MalE durchgeführt. Diese zeigte keinerlei Bindung zu c-di-AMP und somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Bindung an den CBS Domänen stattfindet (siehe Abb. 17, **A**). Um zu überprüfen, inwiefern die Bindung wirklich spezifisch ist, wurden alle drei Proteine darüber hinaus noch mit c-di-GMP vermessen. Dieses unterscheidet sich von c-di-AMP nur durch die stickstoffhaltige Base (Guanin statt Adenin). Guanin weist neben der Aminogruppe (an anderer Position) noch eine zusätzliche Hydroxylgruppe auf (siehe Abb. 17, **B**). Für CBS-BA konnte erfolgreich gezeigt werden, dass c-di-GMP trotz der großen Ähnlichkeit zu c-di-AMP nicht bindet. Bei CBS-CA wurde am Ende eine K_D von circa 50 µM bestimmt, was knapp 6 Mal schwächer ist als die Affinität zu c-di-AMP (siehe Abb. 17, **C**).

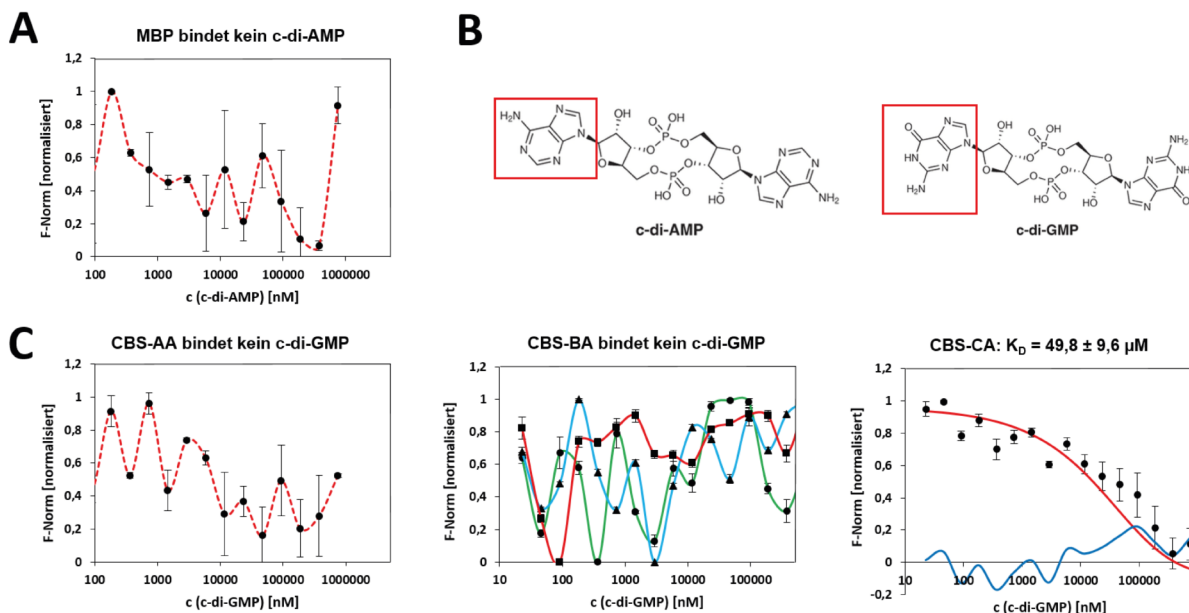


Abbildung 17: Negativkontrollen der MicroScale Thermophorese. (A) MST mit dem Maltosebindeprotein MalE aus *E. coli* (Produktion und Reinigung des Leervektors pMal-c2) zeigt keine Bindung von c-di-AMP. (B) Struktureller Unterschied der beiden Second Messenger c-di-AMP und c-di-GMP. (C) MST mit den drei CBS Domänen und c-di-GMP. Keine Bindung bei CBS-AA und CBS-BA; Affinität von CBS-CA zu c-di-GMP liegt bei 50 µM. Abbildungen A und C modifiziert nach Dr. Sven-Andreas Freibert.

Aus diesem Grund wurde auch HDX-MS nochmal mit CBS-CA und c-di-GMP durchgeführt. Das Ergebnis zeigte allerdings keine Bindung von c-di-GMP an CBS-CA (siehe Anhang Abb. 42, S. 122). Es wird davon ausgegangen, dass es im MST Experiment womöglich keine spezifische Bindung von c-di-GMP an CBS-CA war. Eventuell hat präzipitiertes Protein dafür gesorgt, dass eine K_D bestimmt werden konnte, der wesentlich schlechtere Fit der Kurve deutet zumindest darauf hin.

Durch dieses Kontrollexperiment konnte auch gezeigt werden, dass auch c-di-GMP nicht an CBS-AA bindet. Damit bleibt der Bindungspartner von CBS-AA an dieser Stelle offen. Für die weitere biochemische Analyse der Bindung von c-di-AMP an die CBS Domänen der Opu-Transporter wurde sich im Wesentlichen auf CBS-BA konzentriert.

5.4.4 Mutationen in CBS-BA und deren Auswirkung auf die Bindung von c-di-AMP

Um zu analysieren, welche Aminosäuren an der Bindung von c-di-AMP an CBS-BA beteiligt sind, wurden verschiedene Mutanten des Proteins konstruiert (siehe Abb. 18 und Abb. 19): Zum einen liegen die mutierten Aminosäuren direkt in der Bindetasche (V261, S283, K342 und Y343), zum anderen befinden sich diese im Bereich wo die Dimerisierung der CBS Domänen der beiden NBDs stattfindet (R359 und D364). Da im Folgenden immer wieder auf die Analyse von *Lm* CBS-CA Bezug genommen wird, ist zu beachten, dass *Bs* OpuBA in der ATPase Domäne eine Aminosäure mehr besitzt und deswegen die Nummerierung überall plus eins ist.

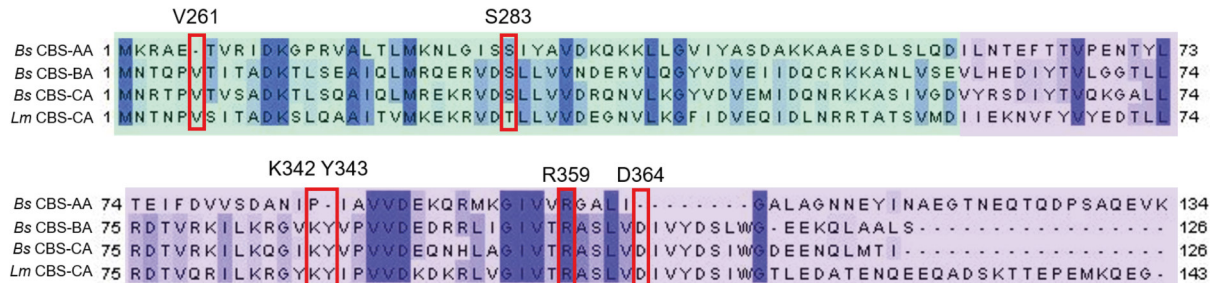


Abbildung 18: Sequenzalignment der Opu CBS Domänen von *B. subtilis* und *L. monocytogenes* mit Mutationen. CBS1 und 2 sind grün bzw. violett hinterlegt. Markiert sind die Aminosäuren, welche für diese Arbeit mutiert wurden. Nummerierung bezieht sich auf *Bs* OpuBA.

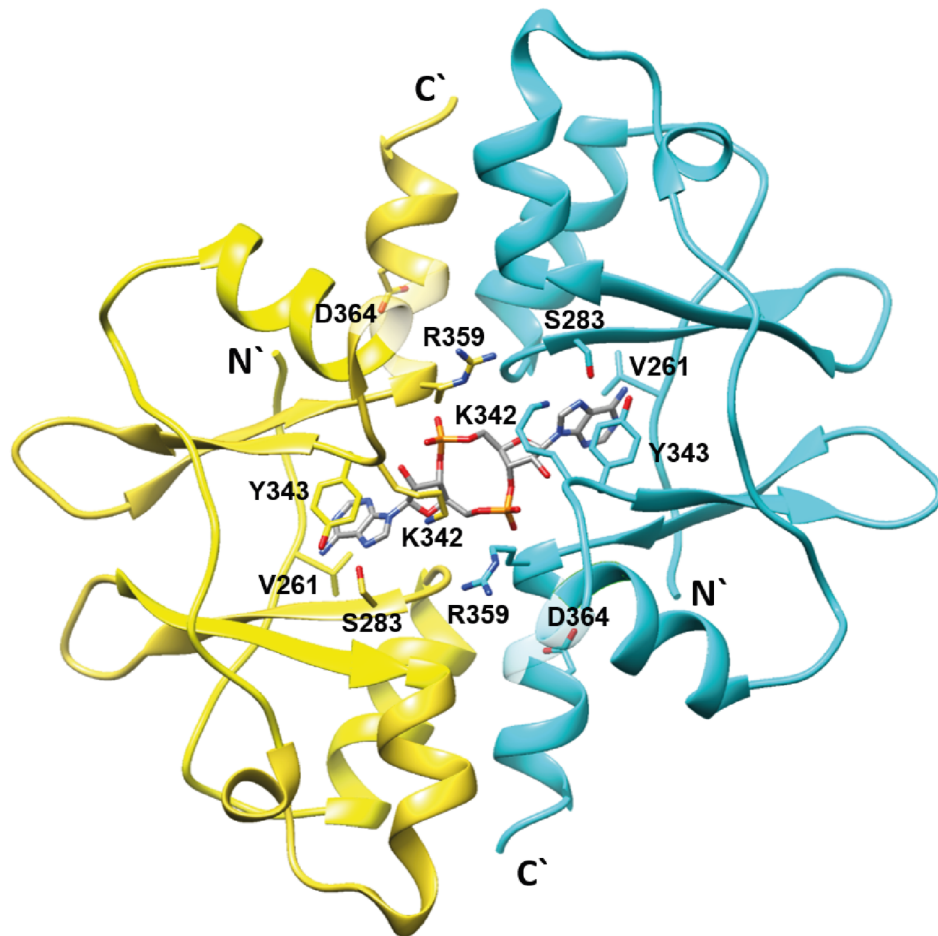


Abbildung 19: Übersicht aller Aminosäuren in der CBS Domäne von OpuBA, welche im Rahmen dieser Arbeit mutiert wurden. Aminosäuren jeweils in Monomer 1 (gelb) und Monomer 2 (blau) markiert. N' = N-Terminus, C' = C-Terminus.

Analog zu den Wildtyp CBS Domänen, wurde die Bindungsaffinität für die Mutanten mittels *MicroScale Thermophoresis* ermittelt (siehe Tab. 21): Unter den 10 gewählten Mutanten gibt es vier, die kein c-di-AMP mehr binden. Bei denen, die noch c-di-AMP binden, liegt die Affinität (K_D) im Bereich des Wildtyps, bis auf D364K, die mit $2,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$ c-di-AMP besser zu binden scheint. Es gibt somit von den konstruierten Mutanten keine, die im Bereich zwischen „bindet wie Wildtyp“ und „bindet kein c-di-AMP mehr“ liegt.

Tabelle 21: Ergebnisse der *MicroScale Thermophoresis* für die CBS-BA Mutanten. Für jede Mutante wurde sowohl die Dissoziations- als auch die Assoziationskonstante bestimmt. Daneben wurde die Gibbs Freie Energie (ΔG) berechnet: $\Delta G = R \cdot T \cdot \ln(K_D)$. Mutanten, die kein c-di-AMP mehr binden (n. d.), sind rot markiert.

| Mutation | Dissoziationskonstante | | Assoziationskonstante | | ΔG (kcal) |
|------------|------------------------|-------|-----------------------|-------|-------------------|
| | K_D (μM) | StabW | K_A (mM^{-1}) | StabW | |
| V261A | 15,8 | 6,0 | 63,3 | 24,0 | 9,7 |
| V261E | n. d. | n. d. | n. d. | n. d. | n. d. |
| S283A | 9,8 | 1,7 | 102,0 | 17,7 | 9,4 |
| K342E | 16,9 | 3,1 | 59,2 | 10,9 | 9,7 |
| Y343F | 14,0 | 3,0 | 71,4 | 15,3 | 9,6 |
| Y343W | n. d. | n. d. | n. d. | n. d. | n. d. |
| Y343A | n. d. | n. d. | n. d. | n. d. | n. d. |
| KY342/343P | n. d. | n. d. | n. d. | n. d. | n. d. |
| R359A | 24,0 | 5,2 | 41,8 | 9,0 | 9,9 |
| D364K | 2,6 | 0,9 | 392,2 | 135,4 | 8,6 |

Für eine Auswertung der ermittelten Dissoziationskonstanten wurden die Mutanten im CBS-BA Modell genauer betrachtet: Das Valin an Position 261 liegt in Bereich des Adenins vom c-di-AMP (siehe Abb.20, **A**). Das N-Atom im Backbone vom Valin bildet eine Wasserstoff (H)-Brücke zum N-Atom des Adenins. Aus diesem Grund hat eine Mutation keinen Einfluss auf diese Bindung. Die einzige Aminosäure in der Umgebung ist das Glutamat an Position 279. Dieses ist allerdings in eine andere Richtung geneigt. Das Fehlen zweier Methylgruppen durch die Mutation zu Alanin hat keine Auswirkungen und führt deswegen mit einer K_D von $15,8 \pm 6,0 \mu M$ zu einer ähnlichen Affinität wie der Wildtyp. Durch die Mutation zu Glutamat wird die Situation in CBS-AA nachgestellt. Die Länge des Glutamats und die zwei zusätzlichen Ladungen reichen aus, um die Bindung zu c-di-AMP komplett zu verhindern.

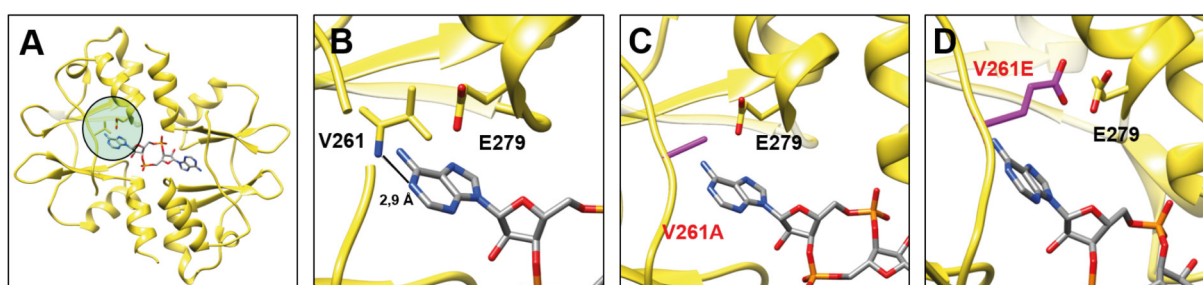


Abbildung 20: Auswirkung einer Mutation von Valin261. (A) Lage von V261 in der CBS Domäne. (B) H-Brücke zwischen dem Backbone N-Atom von V261 und Adenin vom c-di-AMP. (C) Mutation von V261 zu Alanin führt zum Verlust zweier Methylgruppen, die H-Brücke bleibt bestehen. (D) Mutation von V261 zu Glutamat und damit Einfügen zweier zusätzlicher negativer Ladungen.

Das Serin an Position 283 liegt zusammen mit D282, K342 und Y343 des gleichen Monomers ebenfalls im Bereich des Adenins vom c-di-AMP, allerdings auf der gegenüberliegenden Seite vom Valin an Position 261 (siehe Abb. 21, **A**). Die Hydroxylgruppe vom Serin bildet eine H-Brücke zu einem N-Atom vom Adenin. Diese geht durch die Mutation zu Alanin verloren. Dieser

Verlust reicht allerdings nicht aus um die Bildung zu c-di-AMP komplett zu verhindern, denn es wurde eine K_D von $9,8 \pm 1,7 \mu\text{M}$ gemessen. Die anderen Aminosäuren in der Umgebung scheinen somit auszureichen um das c-di-AMP in der Bindetasche zu koordinieren.

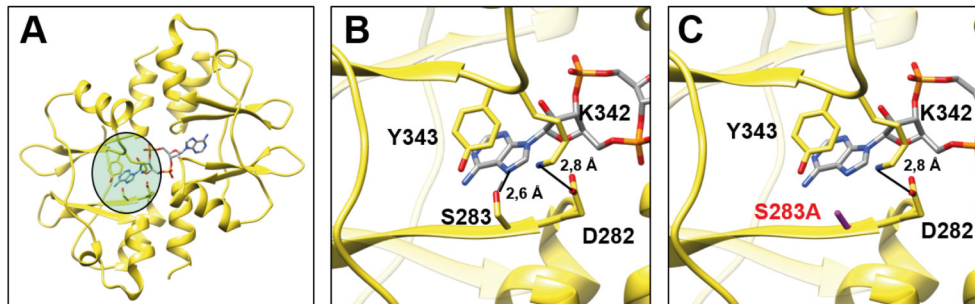


Abbildung 21: Auswirkung einer Mutation von Serin283. (A) Lage von S283, D282, K342 und Y343 in der CBS Domäne. (B) H-Brücken zwischen S283 und dem N-Atom des Adenins bzw. zwischen D282 und K342. (C) Mutation von S283 zu Alanin und damit verbundener Verlust der H-Brücke.

Das Lysin an Position 342 und das darauffolgende Tyrosin sind sowohl in *Bs* CBS-BA und CA als auch in *Lm* CBS-CA vorhanden und scheinen an der Koordination des Adenins beteiligt, obwohl keine direkten Wechselwirkungen eingegangen werden. In Bezug auf Tyrosin343 war für diese Arbeit zunächst von Interesse, ob es für eine Bindung ausreicht, dass ein Aromat an der Stelle ist (Tyrosin, Phenylalanin bzw. Tryptophan) oder ob nur Tyrosin zu einer Bindung von c-di-AMP führt (siehe Abb. 22, A und B). Der Wegfall der Hydroxylgruppe durch eine Mutation zu Phenylalanin hat keinen Einfluss auf die Bindung, da die K_D mit $14 \pm 3 \mu\text{M}$ etwa der Affinität des Wildtyps entspricht. Das Doppelringsystem des Tryptophans hingegen scheint schon auszureichen um die Bindung von c-di-AMP zu verhindern. Damit ist offensichtlich ein einfacher Aromat an der Stelle wichtig für die Bindung, die Hydroxylgruppe vom Tyrosin spielt keine tragende Rolle. Ganz ohne aromatischen Ring (durch die Mutation zu Alanin) wird hingegen kein c-di-AMP mehr gebunden. Bei *L. monocytogenes* allerdings konnte bei Y342A noch Bindung detektiert werden, wenn auch schlechter als der Wildtyp (Huynh et al., 2016b). Die Aufnahme des kompatiblen Soluts Carnitin in einem Stamm, der kein c-di-AMP mehr abbauen kann ($\Delta pdeA \Delta pgpH$), wurde durch diese Mutation negativ beeinflusst. Damit bleibt die Frage offen, inwiefern die Bindung von c-di-AMP den Transporter abschaltet, da hier eine Mutation, die zu einer geringeren Affinität zu c-di-AMP führt, *in vivo* den Transporter schlechter macht.

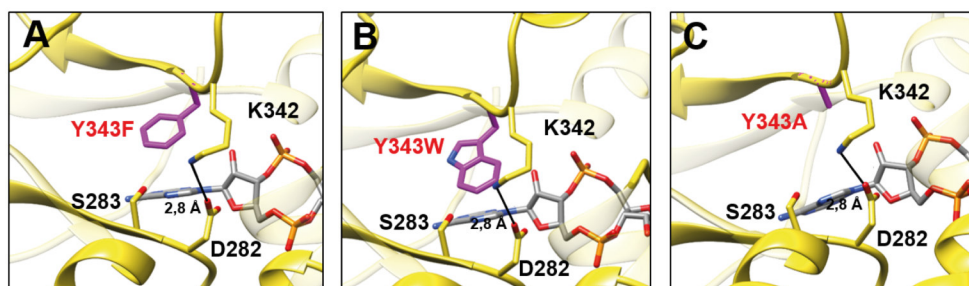


Abbildung 22: Wichtigkeit des aromatischen Rings von Tyrosin343 für die Bindung an c-di-AMP. (A) Mutation von Y343 zu Phenylalanin führt zu einem Verlust der Hydroxylgruppe. (B) Mutation von Y343 zu Tryptophan fügt statt einem einfachen aromatischen Ring ein Doppelringsystem ein. (C) Mutation von Y343 zu Alanin führt zum kompletten Verlust des Aromaten.

Wie bereits erwähnt, sind Lysin342 und Tyrosin343 in vielen CBS Domänen vorhanden, bei *Bs* CBS-AA befindet sich jedoch Prolin an der Stelle. Um diese Situation nachzustellen, wurde die Mutante KY342/343P ebenfalls konstruiert. In den Overlays von Abb.23, **A** und **B** wird deutlich, welche Auswirkungen das hat: Durch den Verlust einer Aminosäure verändert sich die Lage von vielen umliegenden Aminosäuren, besonders in Richtung der vorangegangenen Helix. Damit wird das Protein an dieser Stelle „zusammen gezogen“ und c-di-AMP passt vermutlich weniger gut in die Bindetasche (keine Bindung mehr laut MST). Des Weiteren fehlt die Koordination durch den aromatischen Ring vom Tyrosin. Da der Rest des Proteins aber nicht CBS-AA sondern CBS-BA entspricht, müsste in Folgeexperimenten mit dieser Mutante genauer überprüft werden, inwiefern die Faltung des Proteins durch diese Änderung beeinflusst ist.

Die Mutation von Lysin342 zu Glutamat (siehe Abb. 23, **C**) liefert interessanterweise mit $16,9 \pm 3,1 \mu\text{M}$ eine K_D ähnlich dem Wildtyp. Durch die entgegengesetzte Ladung und den Verlust der H-Brücke zu D282 wurde erwartet, dass die Affinität schlechter ist, wenn nicht sogar das Verlorengelangen der Bindung. Bei der Analyse von *Lm* CBS-CA ergab die Mutation dieses Lysins zu Alanin sogar eine bessere Bindung von c-di-AMP (Huynh et al., 2016b). Hingegen konnte durch eine Mutation von D282 zu Alanin die Bindung verhindert werden. Offensichtlich kommt es an der Stelle nicht nur darauf an, dass die H-Brücke verloren geht, sondern zu welcher Aminosäure mutiert wird, was völlig unterschiedliche Effekte hervorruft. *In vivo* wurden diese beiden Mutationen in *L. monocytogenes* in einem Stamm getestet, der kein c-di-AMP mehr abbauen kann ($\Delta pdeA \Delta pgpH$): Beide Mutationen (K342A und D282A) verschlechterten die Aufnahme von Carnitin im Vergleich zum Wildtyp. Ähnlich wie bei dem Ergebnis für *Lm* CBS-CA Y343A (s. o.) kann an der Stelle die Vermutung, dass c-di-AMP den Transport abschaltet, in Frage gestellt werden. Denn offensichtlich wird der Transport auch verschlechtert, wenn c-di-AMP laut *in vitro* Experimenten besser bindet.

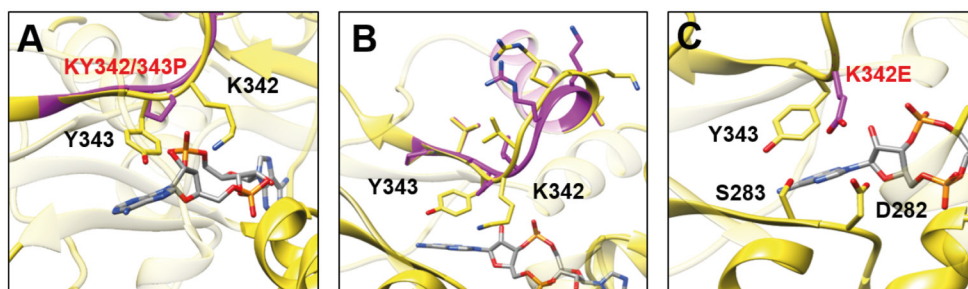


Abbildung 23: Weitere Mutationen an Lysin342 und Tyrosin343. (A) Overlay von KY342/343 mit der Mutation zu Prolin. Prolin an der Stelle spiegelt die Situation in CBS-AA wieder. (B) Auswirkungen der Mutation zu Prolin auf die Lage der umliegenden Aminosäuren. (C) Durch eine Mutation von K342 zu Glutamat werden aus einer positiven Ladung zwei negative Ladungen und die H-Brücke zu D282 geht verloren.

Neben der Koordination von c-di-AMP in den Tiefen der Bindetasche spielt bei der Bindung auch die Bildung des Dimers eine wichtige Rolle. Eine Aminosäure in dem Bereich ist Arginin359 (siehe Abb 24, **A** und **B**). Eine Interaktion mit c-di-AMP gibt es ähnlich wie bei Valin261 durch das N-Atom der Peptidkette. Eine Mutation zu Alanin beeinflusst daher diese Interaktion nicht. Allerdings ist die Bindeaffinität mit einer K_D von $24 \pm 5,2 \mu\text{M}$ geringfügig schlechter als die des Wildtyps. Es könnte sein, dass die Stabilität des Dimers durch das Wegfallen der langen Seitenkette bzw. der positiven Ladungen beeinflusst wird.

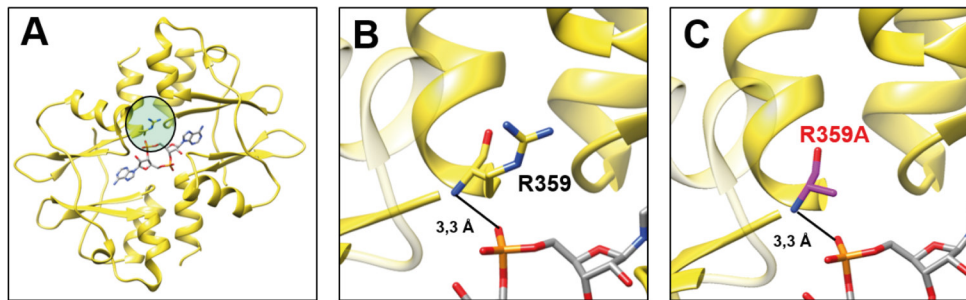


Abbildung 24: Auswirkungen einer Mutation von Arginin359. (A) Lage von R359 im Bereich wo die beiden CBS Monomere dimerisieren. (B) H-Brücke zwischen dem N-Atom von R359 im Backbone und dem O-Atom des c-di-AMP-Phosphats. (C) Eine Mutation zu Alanin führt zum Verlust von drei positiven Ladungen, die H-Brücke bleibt bestehen.

Eine weitere wichtige Aminosäure, die durch eine Salzbrücke zu Arginin280 eine direkte Interaktion mit dem zweiten Monomer eingeht, ist Aspartat364 (siehe Abb. 25, A und B). Das Ziel war es zu prüfen, ob die Bindung von c-di-AMP durch eine entgegengesetzte Ladung verhindert werden kann. Die Mutation zu Lysin allerdings führte zu einer K_D von $2,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$. Diese Affinität erscheint im ersten Moment verwunderlich. Vorstellbar ist, dass durch die entgegengesetzte Ladung die Bildung des Dimers verhindert wird. Eventuell wurde dadurch in der MST die Bindung von c-di-AMP an eines der Monomere gemessen, welche eventuell stärker ist, wenn das zweite Monomer durch die positive Ladung des Lysins “verdrängt” wird. In *L. monocytogenes* wurde D364 nicht mutiert, allerdings das Arginin280 auf der anderen Seite der Salzbrücke (Huynh et al., 2016b). Im Vergleich zu den anderen Mutanten konnte hier wiederum die These zur Funktion von c-di-AMP bestätigt werden: *In vitro* wird bei R280A fast kein c-di-AMP mehr gebunden und das führt *in vivo* im $\Delta pdeA \Delta pgpH$ - Stamm zu einer besseren Aufnahme von Carnitin.

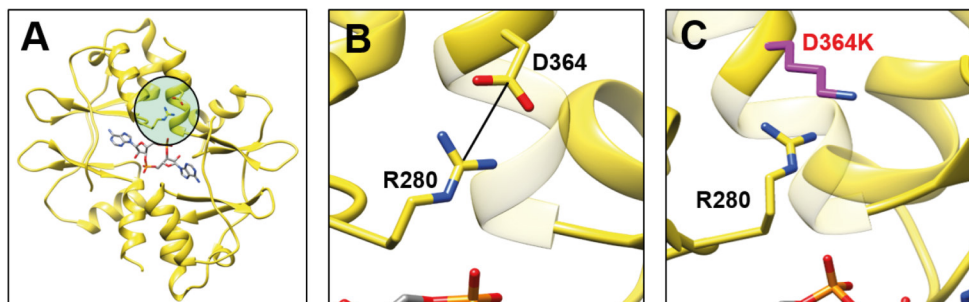


Abbildung 25: Auswirkungen einer Mutation von Aspartat im Interface zwischen den beiden CBS Monomeren. (A) Lage von D364 des einen Monomers und R280 des anderen Monomers. (B) Salzbrücke zwischen D364 und R280. (C) Eine Mutation von D364 zu Lysin ersetzt die beiden negativen Ladungen durch eine positive Ladung und die Salzbrücke geht verloren.

Insgesamt wurde durch die Bestimmung der Affinitäten gezeigt, dass es offensichtlich Aminosäuren gibt, die für die Bindung an c-di-AMP essenziell sind. Einige Mutanten werfen mit ihren Ergebnissen Fragen auf, sodass für weitere Analysen auf alle Fälle die korrekte Faltung der Proteine bestätigt werden muss. Um herauszufinden, welche Funktion die Bindung von c-di-AMP an die CBS Domänen für die Transporter *in vivo* hat, wurden unter Anderem die in diesem Kapitel getesteten Mutanten im Folgenden in Wachstumsexperimenten analysiert.

5.5 Bedeutung der CBS Domänen für Funktion der Opu Transporter *in vivo*

Anhand der biochemischen Charakterisierung der Bindung von c-di-AMP an die CBS Domänen sollte als Ziel dieser Arbeit auch untersucht werden, inwiefern sich Veränderungen in der Aminosäuresequenz der CBS Domänen auf die Funktion der Transporter auswirkt. Neben dem Austausch einzelner Aminosäuren wurde auch beleuchtet, ob die Transporter OpuB und OpuC auch komplett ohne CBS Domänen aktiv sind.

5.5.1 Analyse der OpuBA CBS-Mutanten *in vivo*

Zunächst wurden die CBS Mutanten aus der biochemischen Charakterisierung (siehe 5.4.4) *in vivo* getestet. Hierfür wurde ein Osmoprotektionsassay in SMM durchgeführt. Hierfür wurden alle mutierten *opuB* und *opuC* Gene jeweils in *amyE* eines Stammes integriert, in dem *opuB* und *opuC* am nativen Ort vorher deletiert worden sind. Ein Stamm mit dem in *amyE* integrierten Leervektor pX diente als Kontrolle (HDB12). Die Osmoprotektion wurde mit 25 μ M, 100 μ M und 1 mM Cholin getestet. Insgesamt zeigt das Experiment, dass sich die meisten Mutanten ähnlich wie der Wildtyp verhalten (siehe Abb. 26). Zumindest bei den Bedingungen mit 1,2 M NaCl zeigte keiner der Stämme ein signifikant verändertes Wachstum und die Aufnahme von Cholin scheint nicht beeinträchtigt zu sein.

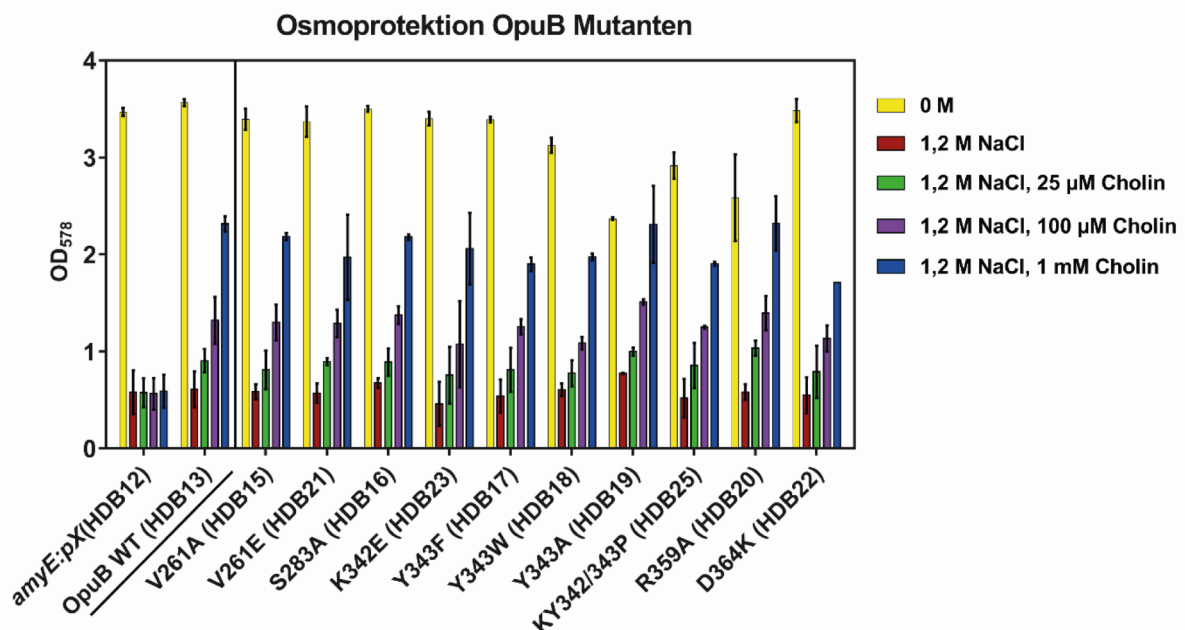


Abbildung 26: Osmoprotektionsassay der CBS Mutanten des Transporters OpuB. Alle Stämme wurden von einer 5 mL SMM Vorkultur in eine 5 mL SMM Hauptkultur (0 M, 1, 2 M NaCl, 1,2 M NaCl + 25 μ M, 100 μ M oder 1 mM Cholin) auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft und die optische Dichte nach 16 Stunden Wachstum gemessen. Standardabweichung von zwei biologischen Parallelen. WT = Wildtyp.

Bei diesem Experiment mit den mutierten CBS Domänen deutet sich an, dass es wahrscheinlich ein Problem im Setup der Experimente gibt. Denn *in vitro* gibt es definitiv Mutanten, die kein c-di-AMP mehr binden, was von der strukturellen Analyse her auch durchaus Sinn ergibt. Das müsste auch *in vivo* einen Effekt haben. Und generell ist es unwahrscheinlich, dass es zwar CBS Domänen an den Nukleotidbindedomänen gibt, diese aber keinen Zweck erfüllen.

5.5.2 Funktion des Transporters OpuB ohne CBS Domänen

Da das Osmoprotektionsassay aus dem vorhergehenden Kapitel die Frage nach der Funktion von c-di-AMP an den Opu Transportern nicht beantwortet werden konnte, ging es im nächsten Schritt um die Frage, ob die Transporter ganz allgemein auch ohne CBS Domänen aktiv sind. Dieses Experiment wurde sowohl für OpuB als auch für OpuC durchgeführt. Für diesen Test erfolgte eine Aufnahme von Wachstumskurven unter osmotischem Stress mit dem kompatiblen Solut Cholin, welches selektiv durch OpuB und OpuC aufgenommen wird. Für die Konstruktion der passenden Stämme wurde ein wieder der Ausgangsstamm verwendet, in dem die Gene für die OpuB und OpuC Transporter am nativen Ort deletiert sind (TMB122). Darin wurde das Gen für den Wildtyp OpuB oder OpuC Transporter mit dem nativen Promotor im Gen *amyE* integriert (Stämme HDB13 bzw. HDB14). Für den Vergleich erfolgte die Integration des jeweiligen Gens ohne CBS Domäne in *amyE* von TMB122 (Stämme HDB47 bzw. HDB48). Eine schematische Darstellung der NBDs OpuBA und OpuCA mit bzw. ohne CBS Domänen ist im Anhang (S. 123, Abb. 43) gezeigt. Als Kontrollen wurden Stämme genutzt, wo *opuB* bzw. *opuC* am nativen Ort exprimiert werden und das Gen für den jeweils anderen Transporter deletiert wurde (Stämme TMB116 [OpuB⁺] und TMB108 [OpuC⁺]). Diese Kontrolle diente dazu um festzustellen, ob die unterschiedlichen Orte der Expression für das Wachstum eine Rolle spielen. Des Weiteren wurde als Kontrolle der Leervektor pX in *amyE* von TMB122 integriert (Stamm HDB12). Letzterer sollte keine Protektion durch Cholin zeigen, da sich weder ein aktiver OpuB, noch ein aktiver OpuC Transporter in diesem Stamm befinden.

Interessanterweise zeigte ein Wachstumsexperiment im Mikrotiterplatten-Photometer (siehe Abb. 27 [OpuB] und im Anhang S. 123, Abb. 44 [OpuC]), dass die Stämme mit den Transportern ohne CBS Domäne analog zum Wildtyp OpuB oder OpuC in der Lage sind, Cholin aufzunehmen. Allerdings weisen beide Stämme mit den Transportern ohne CBS Domänen im Allgemeinen ein verzögertes Wachstum bei allen Bedingungen mit 1,2 M NaCl auf. Da auch das Wachstum ohne Cholin verzögert ist, ist dieses Phänomen nicht auf das Fehlen der CBS Domänen zurückzuführen. Die Kontrollstämme mit den *opuB* bzw. *opuC* Genen am nativen Ort zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die Stämme mit den Transportergenen in *amyE*, sodass der Ort der Expression auf die Funktion der Transporter keinen sichtbaren Einfluss zu haben scheint. Wie erwartet, konnte der Stamm HDB12 ohne OpuB oder OpuC nicht durch Cholin protektiert werden.

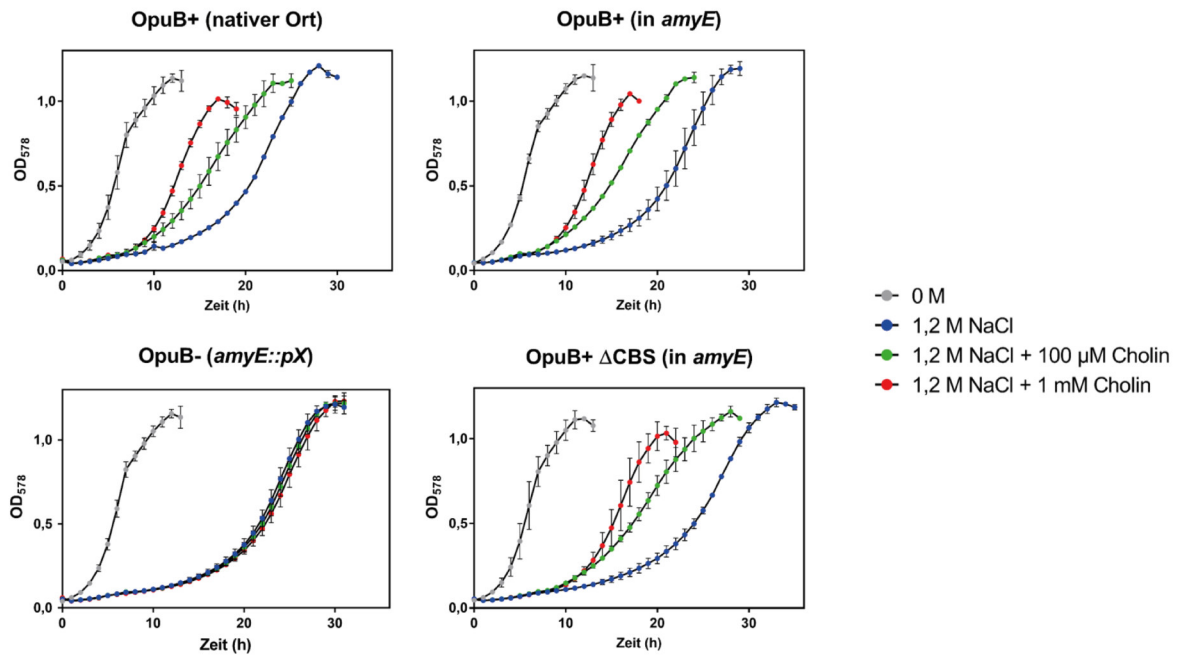


Abbildung 27: Funktion der CBS Domänen für den Transporter OpuB. Wachstumskurven eines Stamms mit dem Transporter OpuB ohne CBS Domäne im Vergleich zum Wildtyp-Transporter. Getestet wurden SMM 0 M, mit 1,2 M NaCl sowie mit dem Zusatz von 100 µM und 1 mM Cholin. Kultivierung der Vorkultur in SMM, Hauptkultur im Mikrotiterplatten-Photometer wurde auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angepft und das Wachstum über 35 Stunden verfolgt. Standardabweichung von zwei biologischen Parallelen.

Für eine genauere Analyse des Wachstums wurden jeweils für die Stämme mit den in *amyE* integrierten Transportergenen die Wachstumsraten in der exponentiellen Wachstumsphase für alle 4 Bedingungen bestimmt (siehe Tab. 22): Darin spiegelt sich das leicht verzögerte Wachstum der Stämme mit OpuB bzw. OpuC ohne CBS Domäne wieder, da für diese Stämme für alle Bedingungen die Wachstumsraten kleiner waren im Vergleich zum jeweiligen Stamm mit dem Wildtyp Transporter.

Tabelle 22: Wachstumsraten der Stämme mit OpuB oder OpuC ± CBS Domäne. Wachstumsraten wurden aus den Wachstumskurven aus Abb. 27 und Anhang Abb. 44 berechnet, dabei aber jeweils nur die Stämme mit den in *amyE* integrierten Transportergenen berücksichtigt. Alle Werte sind in OD₅₇₈/h angegeben.

| Bedingung | OpuB in <i>amyE</i> | | OpuC in <i>amyE</i> | |
|--------------------------|---------------------|------|---------------------|------|
| | Wildtyp | ΔCBS | Wildtyp | ΔCBS |
| 0 M | 0,45 | 0,45 | 0,46 | 0,42 |
| 1,2 NaCl | 0,15 | 0,13 | 0,14 | 0,1 |
| 1,2 NaCl + 100 µM Cholin | 0,17 | 0,15 | 0,17 | 0,13 |
| 1,2 NaCl + 1 mM Cholin | 0,26 | 0,22 | 0,22 | 0,17 |

Sollte die Theorie stimmen, dass das Binden von c-di-AMP an die CBS Domänen den Transporter abschaltet, müsste es in einem Stamm mit OpuB oder OpuC Transporter ohne CBS Domänen zu einer Überakkumulation von Cholin kommen. Cholin selbst dient für *B. subtilis*

nicht als Osmoprotektivum, sondern wird von der Zelle über die Enzyme GbsB und GbsA über das toxische Intermediat Glycinbetain Aldehyd zu Glycinbetain umgewandelt (Boch et al., 1994; Boch et al., 1996; Warmbold et al., 2020). Laut den Wachstumsdaten dieser Arbeit scheint es also möglich zu sein, dass *B. subtilis* den dauerhaft aktiven Transport von Cholin durch eine schnelle Synthese von Glycinbetain kompensieren kann. Des Weiteren scheint die Funktionsweise der gesamten NBD durch das Fehlen der CBS Domäne nicht beeinflusst zu sein.

An dieser Stelle bleibt die Frage offen, unter welchen Bedingungen die Funktion der CBS Domäne bzw. das Binden von c-di-AMP für den Transporter eine Rolle spielt. Kontinuierliches Wachstum unter osmotischem Stress, wie in diesem Experiment und dem vorangegangenen Osmoprotektionsassay getestet (siehe 5.5.1), scheint nicht die Voraussetzung zu sein um den Transporter durch Bindung von c-di-AMP an die CBS Domäne abschalten zu müssen.

5.5.3 Rolle des Mediums für die Analyse der Funktion der CBS Domänen

In vorangegangenen Experimenten anderer Forschungsgruppen in Bezug auf die Rolle von c-di-AMP in *B. subtilis* wurden immer verschiedenste Kultivierungsmedien genutzt. Dabei handelte es sich vor allem um Vollmedien (Oppenheimer-Shaanan et al., 2011; Mehne et al., 2013). Um die Transporter-Funktion näher zu beleuchten ist es wichtig, ein definiertes Minimalmedium einzusetzen um auch kleinste Veränderungen wahrnehmen zu können. Bei der Analyse des neuartigen Kalium-Importers KimA (Gundlach et al., 2017b), wurde ein solches Medium eingesetzt. Im Unterschied zu SMM (Zusammensetzung siehe 4.3.1, Tab. 12), wird in diesem Medium MSMM (modifiziertes SMM) Natriumphosphat (NP) statt Kaliumphosphat (KP) als Puffersystem verwendet. Allerdings ist die Konzentration mit 62,5 mM NP statt 125 mM KP in SMM nur halb so hoch. Da Kalium als Haupt-Kation für das Wachstum von *B. subtilis* essenziell ist (Epstein, 2003; Gundlach et al., 2017a), wird es in MSMM in Form von KCl hinzugegeben (0,1 - 5 mM). Sowohl als Gegenion zu Kalium als auch als Stickstoffquelle wird in MSMM Natrium-Glutamat verwendet. Im Vergleich zu SMM mit 15 mM Ammoniumsulfat, welches pro Molekül zwei Stickstoffatome liefert, ist mit 60 mM Natrium-Glutamat (ein Stickstoffatom pro Molekül) in MSMM die doppelte Menge Stickstoff enthalten. Durch die Nutzung von Natrium-Glutamat in MSMM erhöht sich damit auch die Natriumkonzentration um 60 mM in MSMM. Für die *in vivo* Experimente dieser Arbeit wurde entschieden, SMM in der Form anzupassen, dass 125 mM KP durch 125 mM NP ersetzt wird, um die Pufferkonzentration allgemein konstant zu halten. Des Weiteren soll die gewählte Stickstoffquelle äquimolar zu 15 mM Ammoniumsulfat eingesetzt werden und alle anderen Komponenten beibehalten werden. Dementsprechend wird dieses neue Medium im Folgenden immer als *Natrium-SMM* bezeichnet. Der Vergleich der drei Medien SMM, MSMM und Natrium-SMM in Bezug auf Natrium, Kalium und die Stickstoffquelle ist in Tab. 23 gezeigt.

Tabelle 23: Vergleich der Minimalmedien SMM, MSMM und Natrium-SMM für *B. subtilis*. Aufgelistet ist jeweils die enthaltene Konzentration von Kalium, Natrium sowie der Stickstoffquelle. In allen drei Medien ist Natrium mit 3,9 mM in Form von $\text{Na}_3\text{Citrat} \times 2\text{H}_2\text{O}$ enthalten. Die zusätzlichen Mengen ergeben sich durch Nutzung von NP als Puffersystem sowie der Nutzung von Na-Glutamat als N-Quelle.

| | SMM | MSMM | Natrium-SMM |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------|---|
| K⁺ | 125 mM KP | 0,1 - 5mM KCl | 1 - 5 mM KCl |
| Na⁺ | 3,9 mM | 126,4 mM | 128,9 mM mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 158,9 mM mit Na-Glutamat |
| N-Quelle | 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 60 mM Na-Glutamat | 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oder 30 mM Na-Glutamat |
| Referenz | Spizizen, 1958 | Gundlach et al., 2017b | diese Arbeit |

5.5.3.1 Einfluss der Stickstoffquelle und der Kaliumkonzentration auf das Wachstum

Da es in dieser Arbeit in erster Linie darum geht, die Rolle von c-di-AMP bei osmotisch bedingten Stress zu charakterisieren, wurde im ersten Schritt nach einer Medienzusammensetzung gesucht, wo *B. subtilis* bei 1,2 M NaCl gut wachsen kann. Es war das Ziel, dass dieses Medium dem im Allgemeinen genutzten SMM möglichst ähnlich ist. Aus diesem Grund wurden beim ersten Wachstumsexperiment im Mikrotiterplatten-Photometer der Einfluss der beiden Stickstoffquellen Ammoniumsulfat und Glutamat aus SMM und MSMM bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen getestet.

Das Wachstum bei allen getesteten Bedingungen war ohne NaCl ähnlich zu dem in SMM (Daten nicht gezeigt). Das Wachstum bei 1,2 M NaCl zeigte schon deutliche Unterschiede (siehe Abb. 28, **A**): Während mit Glutamat alle Kulturen unabhängig von der Kaliumkonzentration nach 24 Stunden in etwa gleich gut gewachsen waren, zeigte sich bei Ammoniumsulfat ganz allgemein schon ein deutlich schlechteres Wachstum. Dieses wurde mit abnehmender Kaliumkonzentration immer schlechter bis zu 1 mM KCl, wo die Kultur innerhalb von 24 Stunden fast gar nicht gewachsen war.

In einem weiteren Experiment wurden noch andere Stickstoffquellen getestet, dieses Mal direkt nur mit 1 mM KCl (siehe Abb 28, **B**). Als Vergleich wurden noch einmal SMM, Natrium-SMM mit 30 mM Glutamat sowie mit 15 mM Ammoniumsulfat mitgeführt. Auch hier zeigte sich kein schlechteres Wachstum ohne NaCl (Daten nicht gezeigt). Allerdings stellte sich heraus, dass keine der getesteten Stickstoffquellen zu einem Wachstum bei 1,2 M NaCl und 1 mM KCl führte.

Daraufhin erfolgte ein weiterer Test mit verschiedenen Aminosäuren als Stickstoffquellen (siehe Anhang Abb. 45, S. 124). Alle Aminosäuren wurden sowohl mit 15 mM als auch mit 30 mM getestet. Analog zu den vorangegangenen Experimenten, führten nur 30 mM Glutamat in Natrium-SMM zu einem guten Wachstum von *B. subtilis*.

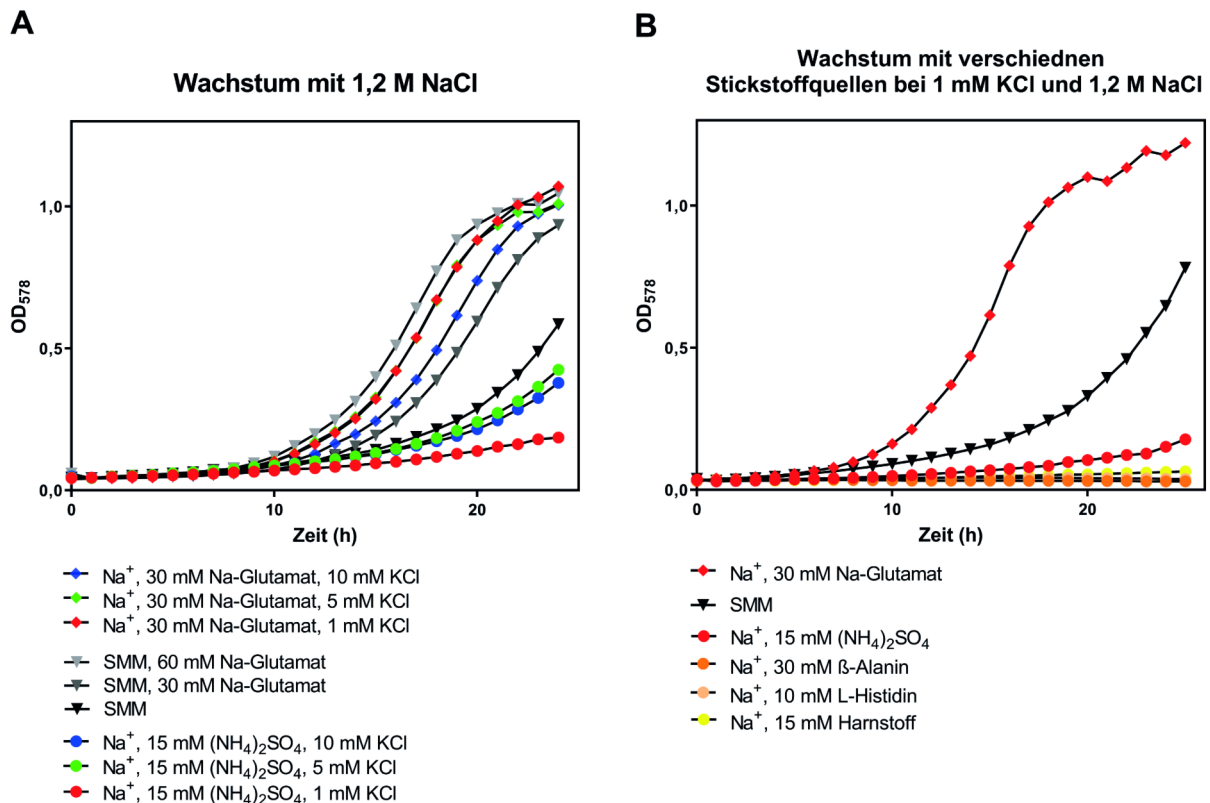


Abbildung 28: Test von verschiedenen Stickstoffquellen und Kaliumkonzentrationen beim Wachstum unter osmotischem Stress (1,2 M NaCl). Die Zellen wurden in SMM oder Natrium-SMM vorkultiviert, auf eine OD₅₇₈ von 0,1 im Mikrotiterplatten-Photometer angeimpft und das Wachstum über 24 Stunden verfolgt. **(A)** Wachstum in SMM oder in Natrium-SMM mit Glutamat oder Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen. **(B)** Wachstum in Natrium-SMM bei 1 mM KCl mit verschiedenen Stickstoffquellen.

Zusammenfassend zeigten alle diese Experimente, dass bei der Nutzung von Glutamat als Stickstoffquelle bei 1,2 M NaCl ein Wachstum möglich ist und das unabhängig von der Kaliumkonzentration im Medium (10, 5 oder 1 mM KCl). Ammoniumsulfat kann bei osmotischen Stress nur eingeschränkt als Stickstoffquelle dienen, da bei 1 mM KCl die Kulturen nicht mehr wachsen. Infolgedessen wurden weitere Experimente mit Glutamat durchgeführt.

5.5.3.2 Wachstum der $\Delta proHJ$ Mutante bei 1,2 M NaCl

Wie unter 5.5.3.1 gezeigt, scheint Glutamat in Natrium-SMM bei osmotischem Stress die einzige, gut nutzbare Stickstoffquelle für *B. subtilis* zu sein. Allerdings spielt Glutamat als Vorläufermolekül der Aminosäure Prolin noch eine ganz andere tragende Rolle bei der Osmostress-Antwort. Bei osmotischen Stress werden nach der schnellen Aufnahme von Kalium-Ionen selbige wieder exportiert und durch aus Glutamat *de novo* synthetisiertes Prolin ersetzt, falls kein anderes kompatibles Solut extrazellulär zur Verfügung steht (Whatmore et al., 1990). Prolin kann bei Wachstum in SMM mit 1,2 M NaCl in Mengen bis um die 500 mM in der Zelle akkumuliert werden (Brill et al., 2011a; Hoffmann et al., 2013; Hoffmann et al., 2017b). Das verbesserte Wachstum in Na-SMM mit Glutamat als Stickstoffquelle spiegelt sich auch in den Prolin Pools wieder, welche für diese Bedingungen gemessen wurden (siehe Abb. 29): Während es ohne NaCl keinen Unterschied in der intrazellulären Prolinkonzentration gibt, ist diese bei 1,2 M NaCl in Na-SMM mit ~700 mM Prolin schon deutlich erhöht. Für SMM war das Ergebnis

wie erwartet ~ 500 mM Prolin. Ein weiterer Effekt ist, dass in SMM mit NaCl und Glycinbetain als kompatibles Solut der Pool wieder kleiner ist, da für *B. subtilis* die Aufnahme von kompatiblen Soluten viel weniger Energie kostet, als die *de novo* Synthese von Prolin (Oren, 1999). In Na-SMM kann dieser Effekt nicht komplett erzielt werden, die Prolinkonzentration ist auch mit Glycinbetain mit ~ 300 mM noch deutlich erhöht.

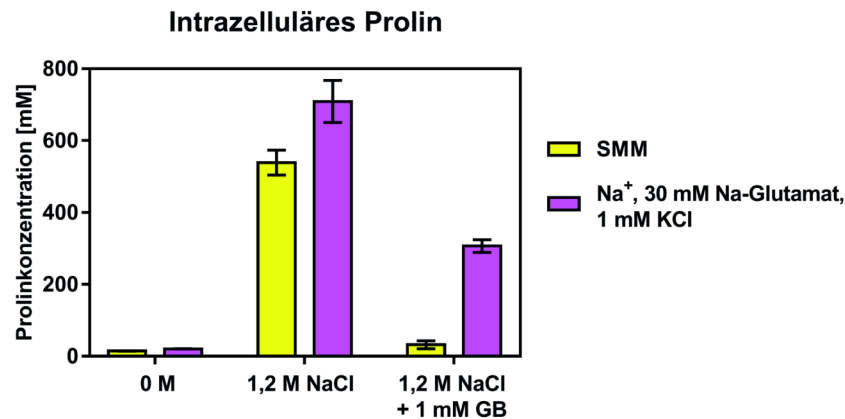


Abbildung 29: Vergleich der intrazellulären Prolinkonzentration in *B. subtilis* in SMM und Natrium-SMM. Die Zellen wurden im jeweiligen Medium ohne NaCl vorkultiviert und in der Hauptkultur (0M; 1,2 M NaCl und 1,2 M NaCl + 1 mM Glycinbetain) auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von ~ 1,5 kultiviert. SMM enthält 125 mM K⁺ und 15 mM Ammoniumsulfat als N-Quelle, Na-SMM enthält 125 mM Na⁺, 1 mM K⁺ und 30 mM Na-Glutamat als Stickstoffquelle. In den geernteten Zellen wurde anschließend die intrazelluläre Prolinkonzentration bestimmt.

Um in den Wachstumsanalysen den zusätzlichen osmoprotektiven Effekt von Glutamat auszuschalten, es aber dennoch als Stickstoffquelle zu nutzen, wurde in Folgeexperimenten eine $\Delta proHJ$ Mutante (Stamm JSB8) verwendet. Die Gene *proH* und *proJ* kodieren neben *proA* für Enzyme, welche für die *de novo* Synthese von Prolin aus Glutamat bei osmotischem Stress verantwortlich sind. Der Stamm JSB8 ist sensitiv gegenüber osmotischem Stress und wächst in SMM mit 1,2 M NaCl deutlich langsamer (Brill et al., 2011a). In Na-SMM (siehe Abb. 30) ist der Effekt ähnlich. Schon mit 5 mM KCl erreicht der Stamm erst nach circa 42 Stunden eine OD₅₇₈ von ~ 1,3 und geht dann in die stationäre Phase über. Mit 1 bzw. 0,1 mM KCl wächst JSB8 nicht weiter als OD₅₇₈ = 0,5 bzw. 0,3. Allerdings gibt es bei gleicher Kaliumkonzentration keinen bzw. kaum einen Unterschied zwischen 30 mM und 60 mM Glutamat. Ersteres ist die äquimolare Konzentration zum Ammoniumsulfat in SMM und letzteres wird in MSMM bei Gundlach et al., 2017b verwendet.

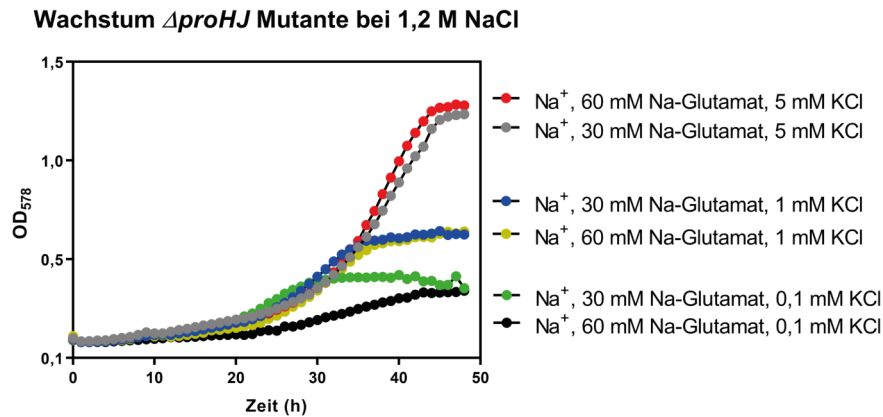


Abbildung 30: Wachstum der $\Delta proHJ$ Mutante in Natrium-SMM mit verschiedenen Kalium- und Glutamatkonzentrationen. Die Zellen wurden in Na-SMM mit 5 mM KCl und 30 mM Glutamat vorkultiviert, auf eine OD₅₇₈ von 0,1 im Mikrotiterplatten-Photometer angeimpft und das Wachstum über 50 Stunden verfolgt.

Insgesamt zeichnet sich durch dieses Experiment schon ab, dass die $\Delta proHJ$ Mutante für die niedrigen Kaliumkonzentrationen eher ungeeignet ist, da die Zellen zum einen sehr langsam wachsen und zum anderen keine besonders hohe optische Dichte erreichen.

5.5.3.3 Funktionstest der Opu Transporter in Natrium-SMM

Vor der Analyse der Transporter mit modifizierten CBS Domänen, erfolgte in einem ersten Schritt der Test der Opu Transporter im Allgemeinen. Hierfür wurden Stämme genommen, die mit Ausnahme von OpuE nur noch einen Opu Transporter enthalten (SBB1 [OpuA⁺], SBB5 [OpuB⁺], SBB2 [OpuC⁺] und SBB3 [OpuD⁺]). Sowohl in JH642 als auch in diesen Stämmen wurde für den Test in Na-SMM mit Glutamat noch zusätzlich das *proHJ* Operon deletiert, was zu den Stämmen HDB84 - HDB88 führte. Für den Wachstumstest erfolgte die Kultivierung in Na-SMM mit 5 mM KCl und 30 mM Glutamat, was in der $\Delta proHJ$ Mutante zu einem relativ guten Wachstum unter Salzstress führte (siehe 5.5.3.2). Um die Transporter zu testen, wurden unter Salzstress (1,2 M NaCl) die kompatiblen Solute Glycinbetain, Cholin und Prolin gewählt. Während Glycinbetain von OpuA, OpuC und OpuD aufgenommen werden kann, wird Cholin nur durch OpuB und OpuC transportiert. Prolin diente als Kontrolle, da es nur von OpuE aufgenommen werden kann und OpuE in allen Stämmen noch vorhanden ist. Wie in Abb. 31, B zu sehen, zeigen alle Transporter noch das erwartete Verhalten. Während zum Beispiel die Zugabe von Glycinbetain dem OpuA⁺, OpuC⁺ und dem OpuD⁺ Stamm einen Wachstumsvorteil verschafft, wächst OpuB⁺ mit Glycinbetain genauso wie ohne kompatibles Solut. Analog trifft das für Cholin zu. Interessanterweise führt die Zugabe von Prolin bei allen Stämmen zu einem besseren Wachstum als jedes andere compatible Solut, was transportiert wird. Dieses Phänomen ist insofern interessant, als das OpuE zu den Natrium/Solut-Symportern (englisch: **sodium-solute-symporter** [SSS]) gehört und damit bei der Prolinaufnahme Natrium mit transportiert (von Blohn et al., 1997). Durch Natrium-SMM (125 mM Natriumphosphat) mit 30 mM Natrium-Glutamat und der Zugabe von 1,2 M NaCl befinden sich insgesamt 1,355 M Natrium im Medium. Durch die Aufnahme von Glutamat durch den Transporter GltT wird dessen Na-Anteil auch mit in die Zelle aufgenommen (Zaprasis et al., 2015). Allerdings ist Natrium in

größeren Mengen toxisch für die Zelle und ist im Allgemeinen nur gering konzentriert (Górecki et al., 2014). Theoretisch muss bei der Aufnahme von Prolin durch OpuE später mehr Natrium wieder exportiert werden, als wenn zum Beispiel Cholin oder Glycinbetain durch OpuC aufgenommen wird. Deswegen ist es verwunderlich, dass der OpuC⁺ Stamm mit Prolin deutlich besser wächst als mit den anderen beiden Soluten.

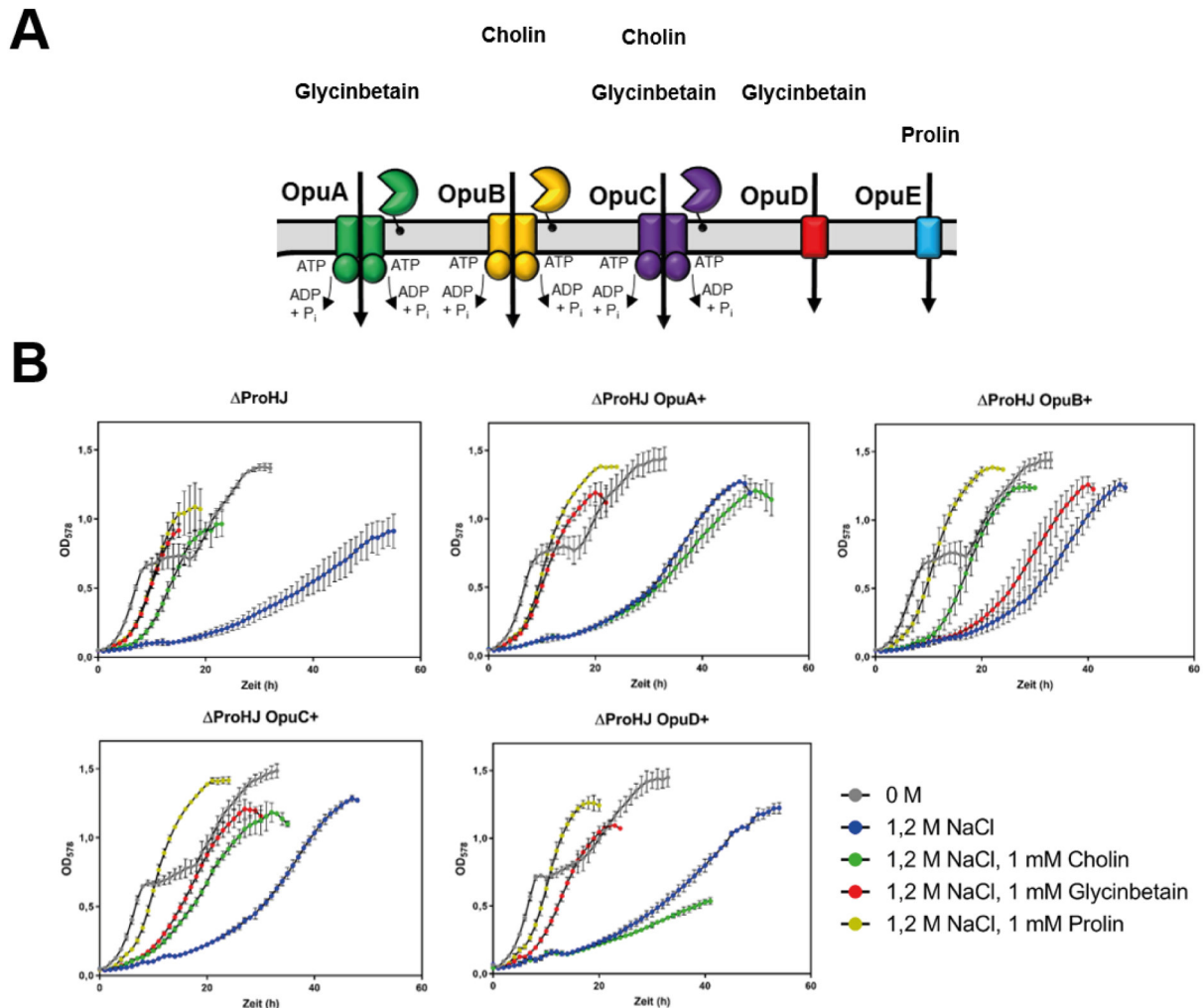


Abbildung 31: Test der Funktion der Opu Transporter in Natrium-SMM. (A) Übersicht der Opu Transporter aus *B. subtilis* und deren Substratspektrum in Bezug auf Glycinbetain, Cholin und Prolin. **(B)** Test der Opu Transporter im $\Delta proHJ$ Hintergrund in Natrium-SMM mit 5 mM KCl und 30 mM Na-Glutamat. Alle Stämme sind OpuE⁺. Wachstum im Mikrotiterplatten-Photometer sowohl ohne NaCl (0 M), als auch mit 1,2 M NaCl ohne und mit den kompatiblen Soluten Glycinbetain, Cholin und Prolin. Angeimpft auf eine $OD_{578} = 0,1$ aus einer Na-SMM Vorkultur. Standardabweichung von drei biologischen Parallelen.

Des Weiteren fällt bei Kultivierung ohne Salz (graue Kurven) auf, dass alle Stämme nach circa 8 Stunden das Wachstum für circa 8-10 Stunden einstellen und dann erst weiter wachsen bis auf eine OD_{578} von ungefähr 1,5. Dieser Effekt zeigte sich auch bei anderen Wachstums-experimenten mit anderen Stämmen in Na-SMM. Eine Anpassung an das Medium dürfte es nicht sein, denn die Vorkultivierung erfolgte bereits im exakt selben Medium bzw. verläuft das Wachstum in den ersten Stunden der Hauptkultur erwartungsgemäß. Des Weiteren ist fraglich, warum dieser Wachstumsstopp in Kulturen mit 1,2 M NaCl nicht stattfindet. Generell führt die Kultivierung in Na-SMM mit Glutamat als Stickstoffquelle auch zu dem Phänomen, dass die

Kulturen nach dem Eintritt in die stationäre Phase fast direkt rapide in die Absterbephase übergehen, was in SMM nicht passiert (Daten nicht gezeigt). Diese Effekte konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter aufgeklärt werden, sind aber interessant in Bezug darauf, was in den Zellen während des Wachstumsstopps und beim schnellen Absterben stattfindet.

5.6 c-di-AMP Konzentrationen in *B. subtilis*

Für ein besseres Verständnis der Regulation verschiedener Zellkomponenten durch c-di-AMP sind die c-di-AMP Konzentrationen in der Zelle von besonderer Wichtigkeit. Für diese Arbeit geht es vor allem um die Frage, ob sich die Konzentration in Abhängigkeit von der Salzkonzentration im Medium ändert, da c-di-AMP auch eine Rolle in der Kalium-Homöostase spielt. Des Weiteren geht es in diesem Zusammenhang darum, welche Effekte das Fehlen von einer oder mehrerer Diadenylylatzyklen bei verschiedenen Osmolaritäten des Mediums hat.

5.6.1 Werte aus der Literatur

Schaut man in die Publikationen der letzten Jahre in Bezug auf c-di-AMP, findet man einige Daten zu c-di-AMP Konzentrationen in *B. subtilis* Zellen, obwohl es als Second Messenger noch wesentlich weniger erforscht ist als zum Beispiel c-di-GMP.

Einer der ersten Werte wurde 2011 publiziert im Zusammenhang mit der Rolle der Diadenylylatzyklase DisA während der Sporulation. Dort findet man für den Wildtypstamm PY79 unter anderem einen Wert von 1,7 μM , welcher dann während der Sporulation auf 5,1 μM ansteigt (Oppenheimer-Shaanan et al., 2011). Allerdings wird nicht genannt, mit welchem Cytoplasma-Volumen dieser Wert berechnet wurde. Das ist von essenzieller Bedeutung um die Werte am Ende miteinander vergleichen zu können. Des Weiteren wurden alle diese Experimente in einem Vollmedium durchgeführt.

Ein Vollmedium wurde auch genutzt, als untersucht wurde, wie sich eine erhöhte c-di-AMP Konzentration auf die Zellen von *B. subtilis* 168 auswirkt. Dort wurde ein Wert von 5,2 ng c-di-AMP/mg Protein für den Wildtyp ermittelt, welcher auf 17,9 ng ansteigt, sobald man GdpP deletiert und zusätzlich eine mutierte Version von CdaS mit höherer Aktivität ektopisch auf einem Plasmid exprimiert (Mehne et al., 2013).

Die Daten aus einer neueren Publikation von 2015 sind generell nicht vergleichbar mit anderen Daten. Da wurde untersucht, wie sich die Deletion der Phosphodiesterasen GdpP und PgpH und die Stickstoffquelle des Mediums auf die c-di-AMP Konzentration auswirkt. In dieser Publikation wird der Wert für den Wildtypstamm 168 mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle auf 1 festgelegt und alle anderen Werte werden als relative Mengen in Bezug auf diesen Wert angegeben (Gundlach et al., 2015).

Über c-di-AMP Konzentrationen bei osmotisch bedingtem Stress sind bisher noch keine Daten bekannt, allerdings im Zusammenhang mit Kalium-Homöostase bei der Charakterisierung des neuartigen Kalium-Importers KimA. Im Vergleich zu vorher genannten Publikationen wurde dabei auch ein Medium verwendet, welches dem in dieser Arbeit genutzten Minimalmediums SMM sehr ähnlich ist. Unterschiede gibt es bei der Verwendung des Puffersystems und dessen Konzentration (62,5 mM Natriumphosphat statt 125 mM Kaliumphosphat) sowie der Stickstoff-

quelle (66 mM Natrium-Glutamat statt 15 mM Ammoniumsulfat). Kalium wurde in Form von Kaliumchlorid in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Es wurde eine c-di-AMP Konzentration von 20 ng c-di-AMP/mg Protein bei 1 mM KCl und eine Konzentration von 40 ng c-di-AMP/mg Protein bei 5 mM KCl ermittelt (Gundlach et al., 2017b). Von allen bisher bekannten Werten sind diese Werte am besten nutzbar als Anhaltspunkt bei der Bestimmung der c-di-AMP Konzentrationen unter osmotisch bedingtem Stress während dieser Arbeit.

5.6.2 Bestimmung der c-di-AMP Konzentration bei verschiedenen Salzkonzentrationen

Die Experimente zur Bestimmung der c-di-AMP Konzentration in *B. subtilis* wurden alle im Minimalmedium SMM mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen durchgeführt. Viele der vorangegangenen Studien wurden im Wildtypstamm 168 durchgeführt. Dem Stamm JH642, welcher hauptsächlich im Labor der AG Bremer verwendet wird, fehlt durch seine 18-Kilobasen Deletion der Transporter KimA, ein wichtiger Transporter für die Kalium-Homöostase (Gundlach et al., 2017b, Tascón et al., 2020). Aus diesem Grund wurde die Bestimmung sowohl für *B. subtilis* 168 als auch JH642 durchgeführt. Als Salzkonzentrationen wurden 0 M; 0,4 M; 0,8 M; und 1,2 M NaCl ausgewählt.

Vor der Extraktion von c-di-AMP wurde die Konzentration von Prolin in allen Proben bestimmt. Die Aminosäure Prolin wird von den Zellen bei osmotischem Stress als Osmoprotektivum akkumuliert, falls kein anderes zum Medium hinzugegeben wird. Allerdings wird Prolin nicht in unbestimmter Menge akkumuliert, sondern genau angepasst an die Salzkonzentration im Medium bis auf einen Pool von circa 400 mM bei einer externen Osmolarität von 1 M NaCl (Hoffmann et al., 2013). Daher kann der Prolin Pool als gutes Maß verwendet werden um festzustellen, welchem osmotischen Stress die *B. subtilis* Zelle ausgesetzt ist. Da die Pools für beide Stämme mit den erwarteten Ergebnissen übereinstimmten (Hoffmann et al., 2013) (siehe Abb. 32, **B**), erfolgte im Anschluss daran die Bestimmung der c-di-AMP Konzentration. Diese zeigte für beide Stämme Werte von 4 - 6 μ M, welche sich auch bei zunehmender Salzkonzentration nicht signifikant veränderten (Abb. 32, **B**). Umgerechnet auf die Proteinmenge bezogen ergeben sich Werte von 12 - 14 ng c-di-AMP pro mg Protein.

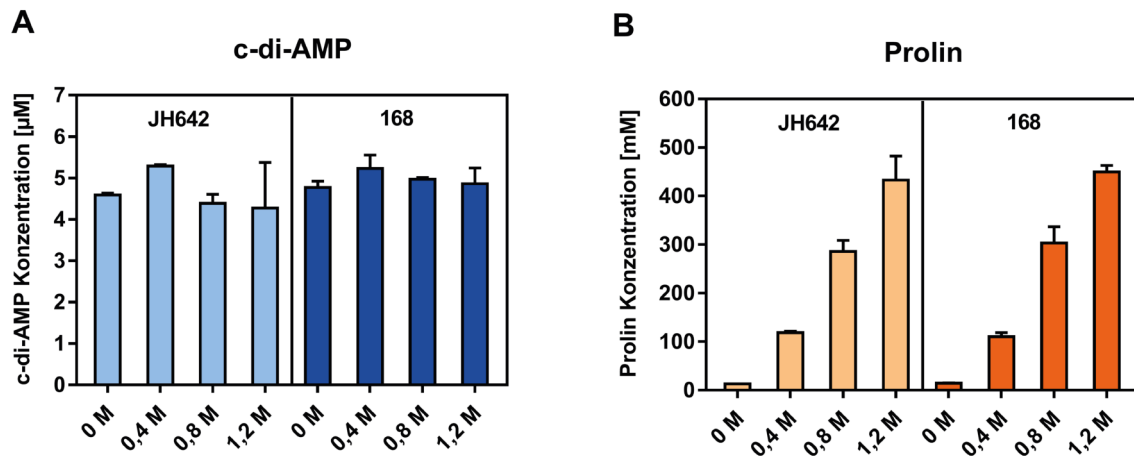


Abbildung 32: C-di-AMP und Prolin Konzentrationen in *B. subtilis* JH642 und 168 *trp*⁺ bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen im Medium. Die Stämme wurden aus einer SMM Vorkultur in SMM mit 0 M; 0.4 M; 0.8 M oder 1.2 M NaCl auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft und bei einer OD₅₇₈ von 1,5 - 1,7 die Konzentrationen von c-di-AMP (A) sowie von Prolin (B) in den Zellen bestimmt. Standardabweichung von zwei biologischen Parallelen.

Dieses Ergebnis zeigt zum einen, dass sich die 18 Kilobasen große Deletion und damit das Fehlen von KimA in JH642 nicht auf die c-di-AMP Konzentration in den Zellen auswirkt. Im Vergleich zu den Werten aus der Analyse von KimA (20 ng c-di-AMP/mg Protein bei 1 mM KCl bzw. 40 ng c-di-AMP/mg Protein bei 5 mM KCl; Gundlach et al., 2017b) liegen die Werte dieser Arbeit mit 12-14 ng c-di-AMP / mg Protein etwas darunter, allerdings auch im niedrigen Nanogramm Bereich. Aufgrund der Unterschiedlichkeit der Medien lassen sich die Werte allerdings nicht richtig gut vergleichen. Zumindest lässt sich durch mehr Kalium, welches mit 125 mM in SMM vorhanden ist, die c-di-AMP Konzentration scheinbar nicht weiter erhöhen. Des Weiteren liegt hier die Vermutung nahe, dass c-di-AMP bei kontinuierlichem Wachstum unter osmotischem Stress eher eine untergeordnete Rolle spielt, weil sich die Pools zumindest nicht erhöht haben nach einer Anpassung über 3-4 Generationen. Um diese Hypothese zu testen, müsste die c-di-AMP Konzentration nach einem osmotischen Schock bestimmt werden. Alternativ könnte es in der Zelle lokal zu erhöhten oder verringerten c-di-AMP Konzentrationen kommen, die infolgedessen regulierend wirken. Das könnte zum Beispiel durch die Diadenylatzyklase CdaA, welche membranständig ist, bewerkstelligt werden. Diese sogenannten „local pools“ wurden schon für den Second Messenger c-di-GMP in *E. coli* nachgewiesen (Sarenko et al., 2017; Richter et al., 2020) und würden bei der hier durchgeführten Messung der Gesamtmenge c-di-AMP nicht erfasst werden.

5.6.3 Bestimmung der c-di-AMP Konzentrationen in den Diadenylatzyklase-Deletionsmutanten

Für diese Arbeit war es des Weiteren von Bedeutung inwiefern sich veränderte c-di-AMP Konzentrationen in der Zelle auf die Regulation der Opu Transporter auswirken. Für die Bildung von c-di-AMP aus zwei Molekülen ATP besitzt *B. subtilis* drei Diadenylatzyklasen: CdaA bildet ein membranständiges Dimer und wird vom extrazellulären CdaR reguliert (Mehne et al., 2013; Heidemann et al., 2019). Eine weitere ist DisA, wobei deren Hauptfunktion das Scannen von DNA Schäden ist (Bejerano-Sagie et al., 2006). Die dritte ist CdaS, welche erst während der

Sporulation exprimiert wird (Mehne et al., 2014). Um die c-di-AMP Konzentration zu verringern, wurden mittels Cre/lox Verfahren (siehe 4.4.10) verschiedene Kombinationen von Deletionsmutanten erstellt. Allerdings können bei den Standard Verfahren zur Transformation nicht alle Deletionen beliebig kombiniert werden und keine Triple Mutante erstellt werden. Aus Gundlach et al., 2017b geht hervor, dass sowohl die Kombination $\Delta disA \Delta cdaA$ als auch die Deletion aller drei Gene nur möglich ist, wenn *B. subtilis* mit maximal 0,1 mM Kalium kultiviert wird. Alle Versuche, diese beiden Kombinationen unter den vorgegebenen Bedingungen zu konstruieren, scheiterten während dieser Arbeit. Damit sind letztendlich die Einzelmутanten der drei Diadenylatzyklen (HDB68 - 70) sowie die Doppelmутanten $\Delta cdaS \Delta disA$ (HDB71) und $\Delta cdaS \Delta cdaA$ (HDB72) entstanden. In diesen Stämmen wurde analog zu den Messungen in JH642 und 168 zunächst die intrazelluläre Konzentration von c-di-AMP bestimmt. Für eine Überprüfung der geernteten Zellen erfolgte auch bei diesem Experiment im Voraus die Messung der Prolin Konzentration (siehe Abb. 33, **B**): Die Pools sind unabhängig von den Deletionen alle ähnlich zum Wildtyp, was auch darauf hindeutet, dass trotz des Fehlens von einer oder mehrerer Diadenylatzyklen die Adaption an 1,2 M NaCl wie im Wildtyp funktioniert. Die c-di-AMP Konzentration in JH642 war bei diesem Experiment mit 3,5 μM ($\hat{=}$ 10 ng / mg Protein) etwas niedriger als im vorherigen Versuch mit JH642 und 168. Die Werte für die c-di-AMP Konzentration in den Mutanten zeigte wiederum schon ohne Salzstress Interessantes (siehe Abb. 33, **A**): Offensichtlich kann das Fehlen von CdaA und CdaS kompensiert werden, da in den Einzelmутanten die Konzentrationen ähnlich zum Wildtyp sind. Für DisA scheint das nicht möglich zu sein, denn hier ist die Konzentration nur bei 1/3 vom Wildtyp. Komischerweise zeigen die beiden Doppelmутanten Konzentrationen zwischen Wildtyp und $\Delta disA$. Zumindest bei $\Delta cdaS \Delta disA$ hätte man bei dem Ergebnis von $\Delta disA$ allein erwartet, dass die Konzentration noch niedriger ist statt höher. Osmotischer Stress in Form von 1,2 M NaCl wirkt sich wiederum im Wildtyp nicht auf die c-di-AMP Konzentration aus, wie bereits bei der Analyse von JH642 und 168 festgestellt (siehe Abb. 32). Allerdings führen sowohl die Einzelmутante $\Delta disA$ als auch $\Delta cdaA$ zu einer sehr niedrigen c-di-AMP Konzentration. Das Fehlen von CdaS wirkt sich jetzt auch aus, allerdings nicht so stark. Auch hier sind die beiden Doppelmутanten interessant, dieses Mal aber eher $\Delta cdaS \Delta cdaA$, denn bei der Kombination ist die Konzentration plötzlich wieder höher als wenn CdaA allein deletiert ist.

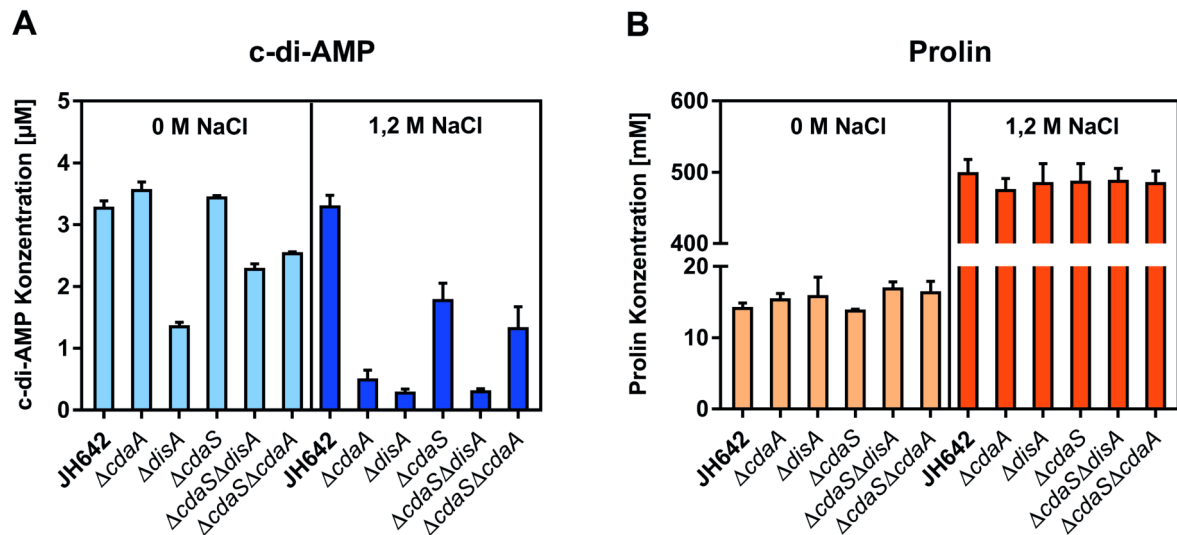


Abbildung 33: C-di-AMP und Prolin Konzentrationen in den Diadenylylase Deletionsmutanten. Die Stämme wurden aus einer SMM Vorkultur in SMM oder SMM + 1,2 M NaCl auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und bei einer OD_{578} von 1,5 - 1,7 die Konzentrationen von c-di-AMP (A) und Prolin (B) in den Zellen bestimmt. Standardabweichung von zwei biologischen Parallelen.

Wie bereits erwähnt, zeigten alle Deletionsmutanten keinerlei Phänotyp in Bezug auf die Anpassung an osmotischen Stress. Auch bei der Kultivierung an sich gab es keine Auffälligkeiten, die optische Dichte von 1,5 – 1,7 erreichten alle Stämme in etwa gleich schnell. Für eine genauere Analyse erfolgte an dieser Stelle noch eine Kultivierung im Mikrotiterplatten-Photometer bei verschiedenen Salzkonzentrationen (0M; 0,4 M; 0,8 M und 1,2 M NaCl). Zum Vergleich der Stämme wurde anhand des Wachstums in der exponentiellen Wachstumsphase die Wachstumsrate μ bestimmt. Wie bereits vermutet, gibt es hier keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Deletionsmutanten (siehe Abb. 34).

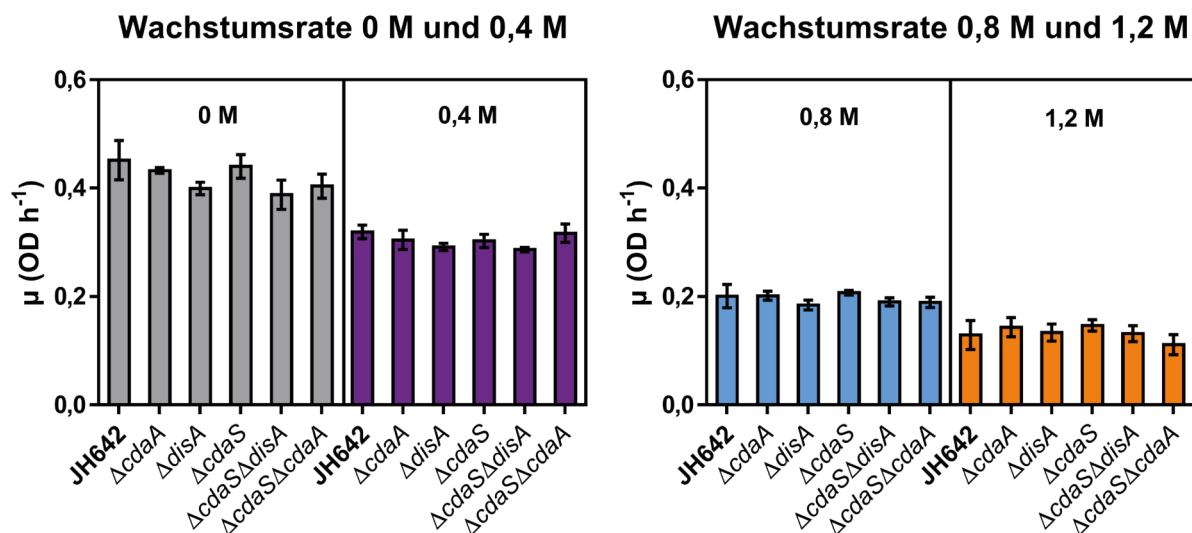


Abbildung 34: Wachstumsraten der Diadenylylase Deletionsmutanten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen. Die Stämme wurden aus einer SMM Vorkultur in SMM mit 0 M; 0,4 M; 0,8 M oder 1,2 M NaCl auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und das Wachstum im Mikrotiterplatten-Photometer über 30 Stunden verfolgt. Anschließend wurde mittels Graphpad Prism aus der logarithmischen Wachstumsphase die Wachstumsrate μ ermittelt. Standardabweichung von vier biologischen Parallelen.

Um wiederum die c-di-AMP Konzentration in der Zelle zu erhöhen, gibt es insgesamt weniger Möglichkeiten. *B. subtilis* besitzt die Gene *pgpH* und *gdpP*, die jeweils für eine membranständige Phosphodiesterase kodieren. Interessanterweise gibt es hier zum einen das Phänomen, dass die c-di-AMP Konzentration maßgeblich von der Stickstoffquelle im Medium abhängt (Gundlach et al., 2015): Nutzt man Glutamin als Stickstoffquelle, bleibt die c-di-AMP Konzentration konstant, unabhängig davon, ob und welche Phosphodiesterase deletiert wurde. Bei Glutamat hingegen erhöht sich sowohl bei $\Delta pgpH$ als auch bei $\Delta gdpP$ die Konzentration. Interessanterweise erhöht sich bei der Doppelmutante $\Delta pgpH \Delta gdpP$ die Konzentration nicht signifikant weiter. Weiterhin muss beachtet werden, dass die Doppelmutante zwar konstruierbar ist, allerdings zur Lyse der Zellen und zu Suppressormutanten in den Diadenylatzyklen führt (Gundlach et al., 2015). Da in dieser Arbeit erst einmal SMM mit Ammoniumsulfat weiterhin genutzt wurde und die Tests mit Glutamat nicht zielführend waren, wurde die Bestimmung von c-di-AMP Konzentrationen in Phosphodiesterase Mutanten nicht weiterverfolgt.

Vergleicht man an der Stelle die c-di-AMP Bestimmungen dieser Arbeit mit denen aus Gundlach et al., 2017b, fällt zum einen auf, dass mit Maximalwerten um die 10 - 14 ng c-di-AMP / mg Protein (statt 20 bzw. 40 ng / mg Protein) die Werte nicht ganz übereinstimmen. Das kann einerseits an den verschiedenen Medien mit viel bzw. wenig Kalium liegen sowie an der Zusammensetzung allgemein. Andererseits wurden die Zellen in dieser Arbeit nicht in der Mitte der exponentiellen Phase ($OD_{578} = 1$), sondern erst bei $OD_{578} = 1,5 - 1,7$ geerntet und damit beim Eintritt in die stationäre Phase. Dafür wäre es interessant die c-di-AMP Konzentration über das gesamte Wachstum hinweg zu bestimmen.

Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von c-di-AMP deuten zum anderen darauf hin, dass ohne Salzstress das Fehlen von einer Diadenylatzyklase (außer DisA) gut kompensiert werden kann. Allerdings zeigen die beiden Doppelmutanten bei beiden getesteten Bedingungen eher unerwartete Ergebnisse. Die Einstellung des passenden c-di-AMP Levels für die Zelle scheint an dieser Stelle komplizierter zu sein.

5.7 Exkurs: Bestimmung des Zytoplasmavolumens von *B. subtilis*

In einem kleinen Teilprojekt dieser Arbeit war es das Ziel, das Zytoplasmavolumen von *B. subtilis* bei verschiedenen Wachstumsbedingungen unter osmotischem Stress zu ermitteln. Dies ist von besonderer Bedeutung, da intrazelluläre Konzentrationen von kompatiblen Soluten oder anderen Dingen wie zum Beispiel c-di-AMP maßgeblich vom Volumen des Zytoplasmas abhängen. Bisher wurde standardmäßig für Konzentrationsbestimmung der Wert 0,65 μL für 1 mL Zellen mit $OD_{578} = 1$ genutzt. Dieser Wert resultiert aus der Doktorarbeit von Susanne Moses (Moses, 1999, Dissertation AG Bremer), die eine Bestimmung mittels radioaktivem Wasser ($^3\text{H}_2\text{O}$) und radioaktivem ^{14}C -Inulin analog zu Whatmore und Reed, 1990 durchführte. Dabei wird ausgenutzt, dass $^3\text{H}_2\text{O}$ frei über die Membran diffundiert, ^{14}C -Inulin hingegen nicht. Gibt man beide Substanzen zu den Zellen, spiegelt die Radioaktivität von $^3\text{H}_2\text{O}$ das Gesamtvolumen (intra- plus extrazellulär) und ^{14}C -Inulin nur das extrazelluläre Volumen wieder. Aus der Differenz lässt sich dann das Zytoplasmavolumen bestimmen. Für unterschiedliche Salzkonzentrationen ergaben sich Volumina von 0,599 - 0,686 μL pro mL $OD_{578} = 1$, sodass in

Folgeexperimenten immer ein Mittelwert von 0,65 μL verwendet wurde (Moses, 1999). Die Methode ist schon sehr genau, da diese wirklich nur das zytoplasmatische Volumen erfasst. Die Dicke der Zellwand wird durch diese Methode automatisch vom Gesamtvolumen mit abgezogen, weil sich $^3\text{H}_2\text{O}$ nur außerhalb der Zelle oder im Zytoplasma befinden kann. Allerdings wird durch den Bezug auf die optische Dichte die Größe der Zellen nicht mit einbezogen. Es könnten sowohl „wenige“ große Zellen als auch eine größere Anzahl kleinerer Zellen sein. Aus ersten mikroskopischen Untersuchungen von *B. subtilis* Zellen ist bekannt, dass besonders unter Hochsalzbedingungen die Zellen insgesamt wesentlich kleiner sind als ohne Salzstress und dass die Zellwand wesentlich dicker ist (unveröffentlichte Daten, Information von Dr. Tamar Hoffmann, AG Bremer). Gestützt wird letztere Beobachtung durch die Erfahrung aus der Laborarbeit, dass solche Zellen mechanisch wesentlich schlechter aufzuschließen sind. Auch wenn das Zellvolumen in 1 mL $\text{OD}_{578} = 1$ unabhängig vom Salzstress mehr oder minder konstant ist, bedeutet das bei Salzstress, dass in einer einzelnen Zelle die Konzentration von allen Soluten und Stoffen wesentlich höher ist als in einer nicht gestressten Zelle. Für diese Arbeit wurde mittels zweier verschiedener Mikroskopie Techniken das Zytoplasmavolumen für *B. subtilis* in einer einzelnen Zelle bestimmt. Hierfür wurden folgende Bedingungen gewählt: SMM, SMM + 1 mM Glycinbetain, SMM + 1,2 M NaCl und SMM + 1,2 M NaCl + 1 mM Glycinbetain.

5.7.1 Bestimmung des Gesamtzellvolumens mittels Rasterelektronenmikroskopie

Mittels Rasterelektronenmikroskopie in Kooperation mit Dr. Karl-Heinz Rexer und Petra Horn (ehemals AG Kost, jetzt AG Junker; Uni Marburg) wurden intakte Zellen mikroskopiert und anschließend deren Gesamtvolumen durch Messung von Länge und Breite ermittelt. Die Präparation erfolgte wie unter 4.7.1 beschrieben. Für die Berechnung wurde näherungsweise angenommen, dass eine *B. subtilis* Zelle aus einem Zylinder und zwei Halbkugeln besteht. Sowohl die Bilder (siehe Abb. 35, **A**), als auch die Werte von zwei verschiedenen Parallelen (siehe Tab 24) zeigen, dass es deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen gibt. Wie bereits oben erwähnt, sind die mit 1,2 M NaCl gewachsenen Zellen deutlich kürzer als die Zellen ohne Salz. Die Breite hingegen ist relativ ähnlich. Des Weiteren fällt auf, dass das kompatible Solut Glycinbetain das Volumen der Zelle vergrößert. Für die Bedingung mit NaCl und Glycinbetain geht der Effekt sogar soweit, dass die Zelle größer ist als ohne Salz und ohne Glycinbetain.

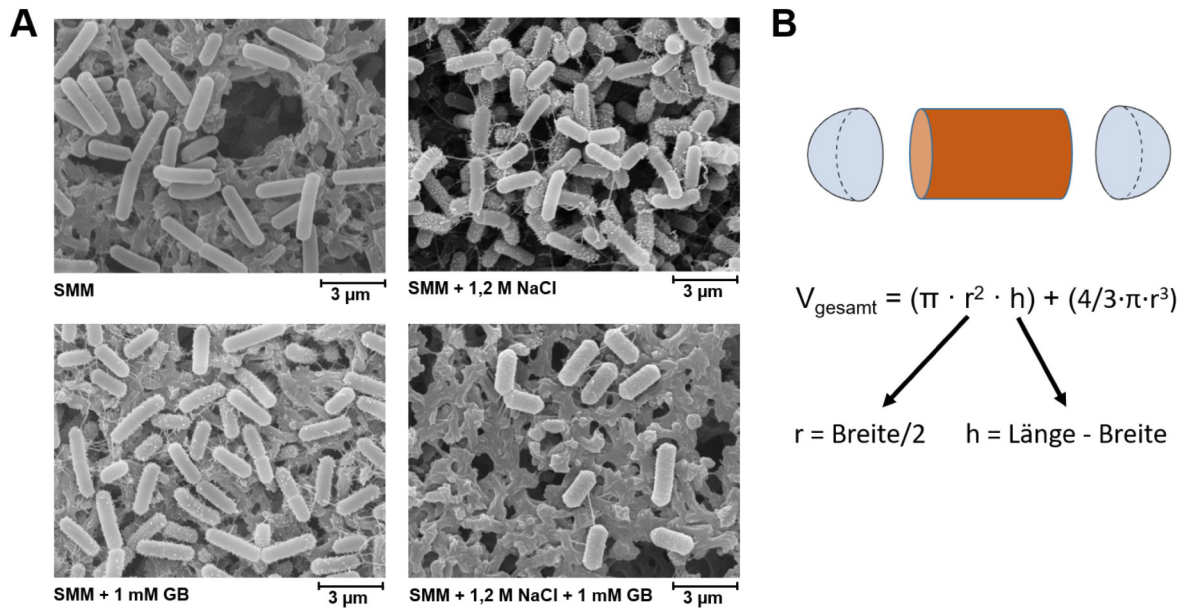


Abbildung 35: Bestimmung des Gesamtzellvolumens durch Rasterelektronenmikroskopie (REM). (A) REM Bilder von intakten *B. subtilis* Zellen. GB = Glycinbetain. (B) Näherungsweise Berechnung des Gesamtvolumens anhand eines Zylinders und zwei Halbkugeln.

Tabelle 24: Berechnete Werte für das Gesamtzellvolumen von *B. subtilis* anhand von REM Bildern. Pro Parallele wurden in etwa 90 - 100 Zellen vermessen. GB = Glycinbetain.

| Bedingung | 1. Parallele | | 2. Parallele | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|
| | Mittelwert (μm^3) | StabW | Mittelwert (μm^3) | StabW |
| SMM | 0,505 | 0,15 | 0,607 | 0,19 |
| SMM + 1 mM GB | 0,731 | 0,18 | 0,630 | 0,19 |
| SMM + 1,2 M NaCl | 0,486 | 0,14 | 0,451 | 0,13 |
| SMM + 1,2 M NaCl + 1 mM GB | 0,984 | 0,30 | 1,019 | 0,25 |

Für die Betrachtung des Zytoplasmavolumens kommt es neben der Gesamtgröße auch auf die Dicke der Zellwand an, welche das Volumen für alle Bedingungen verkleinert. Um diese zu bestimmen, wurden in Folgeexperimenten Schnitte von *B. subtilis* Zellen angefertigt und mittels Transmissionselektronenmikroskop analysiert.

5.7.2 Bestimmung der Zellwanddicke mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Hierfür erfolgte die Kultivierung der Zellen analog zu den REM Experimenten. Um einen Einblick in die Zellen zu bekommen, wurden von den Zellen hauchdünne Schnitte angefertigt, welche anschließend in Kooperation mit Dr. Thomas Heimerl (AG Maier, Uni Marburg) mittels TEM analysiert wurden. Schon beim Betrachten der Bilder (siehe Abb. 36) fällt auf, dass bei 1,2 M NaCl die Zellwand deutlich dicker ist. Allerdings ist diese Verdickung nicht gleichmäßig, sondern variiert innerhalb einer einzelnen Zelle. Aus diesem Grund ist auch die Standardab-

weichung für diese Bedingung relativ hoch (siehe Tab. 25). Des Weiteren zeigen sowohl die Bilder als auch die gemessenen Werte, dass bei allen anderen Bedingungen die Zellwand relativ gleich dick ist, wobei diese mit Glycinbetain etwas zunimmt.

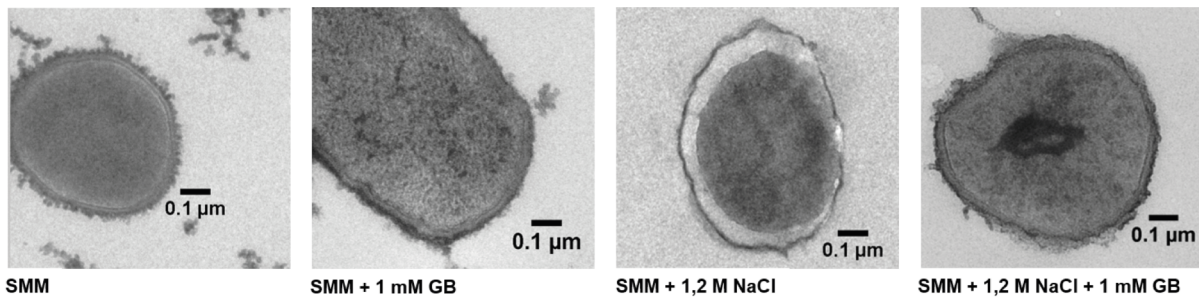


Abbildung 36: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) Bilder von *B. subtilis* Zellen. Zellen wurden nach der Kultivierung unter Hochdruck schockgefroren, das Wasser der Zellen gegen eine organische Lösung ausgetauscht, die Zellen in Kunstharz eingebettet und für die Mikroskopie Schnitte davon angefertigt. GB = Glycinbetain. Weitere Bilder für jede Bedingung sind im Anhang (Abb. 46 - 49, S.125 und S.126) gezeigt.

Tabelle 25: Messungen der Zellwanddicke mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Für jede Parallele wurde die Dicke von etwa 80-90 Zellen vermessen und dafür die Standardabweichung (StabW) berechnet. GB = Glycinbetain.

| Bedingung | 1. Parallele | | 2. Parallele | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|
| | Mittelwert (μm^3) | StabW | Mittelwert (μm^3) | StabW |
| SMM | 0,019 | 0,003 | 0,02 | 0,003 |
| SMM + 1 mM GB | 0,028 | 0,006 | 0,029 | 0,005 |
| SMM + 1,2 M NaCl | 0,055 | 0,024 | 0,048 | 0,017 |
| SMM + 1,2 M NaCl + 1 mM GB | 0,025 | 0,005 | 0,024 | 0,004 |

Bei 1,2 M NaCl weist die Mehrzahl der Zellen eine Verdickung der Zellwand auf, wobei die Färbung dieser Verdickung bei den beiden unterschiedlichen Präparationen unterschiedlich war (siehe Abb. 48, S. 126). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht aufgeklärt werden, ob die Ursache dafür womöglich in der Präparation der Zellen liegt. Des Weiteren bleibt die Frage offen, welcher Bestandteil der Zellwand bei osmotischem Stress verdickt wird.

5.7.3 Zusammenfassung und Auswertung der Daten

Fügt man nun die Daten für das Gesamtvolumen und für die Dicke der Zellwand zusammen, ergibt sich ein interessantes Bild (siehe Tab. 26). Während der Anteil der Zellwand in den Zellen aus SMM, SMM + Glycinbetain und SMM + NaCl + Glycinbetain nur 13 bzw. 18 % ausmacht, wird das Volumen bei den Salzzellen ohne Glycinbetain durch die Zellwand um 31 % verringert.

Tabelle 26: Zusammenfassung der Daten aus REM und TEM. Für jede Bedingung ist jeweils das Gesamtvolumen, das Zytoplasmavolumen, wenn die Zellwand berücksichtigt wird, und die daraus folgende Differenz in Prozent angegeben. Für die Berechnung wurden jeweils die Werte der 2. Parallele von REM und TEM verwendet. GB = Glycinbetain.

| Bedingung | Zellvolumen (μm^3) | Zytoplasmavolumen (Zellwand abgezogen) (μm^3) | Differenz in % |
|----------------------------|---------------------------------|--|----------------|
| SMM | 0,607 | 0,526 | 13 |
| SMM + 1 mM GB | 0,630 | 0,516 | 18 |
| SMM + 1,2 M NaCl | 0,451 | 0,310 | 31 |
| SMM + 1,2 M NaCl + 1 mM GB | 1,019 | 0,890 | 13 |

Vergleicht man nun die Bedingungen miteinander, wird der Unterschied, vor allem zwischen Wachstum mit und ohne Salz noch deutlicher (siehe Abb. 37). Im Vergleich zur Kultivierung ohne Salz wachsen Zellen in SMM + NaCl deutlich langsamer, bleiben im Durchschnitt kleiner und verdicken zum Schutz ihre Zellwand. Insgesamt macht das für das Zytoplasmavolumen einen Unterschied von 41 % aus. Der Unterschied in der Zellgröße zwischen Wachstum mit und ohne Glycinbetain hingegen ist mit 2 % sehr gering. Allerdings sind die Zellen bei Wachstum mit NaCl und Glycinbetain mehr als 1,5 Mal so groß wie die SMM Zellen.

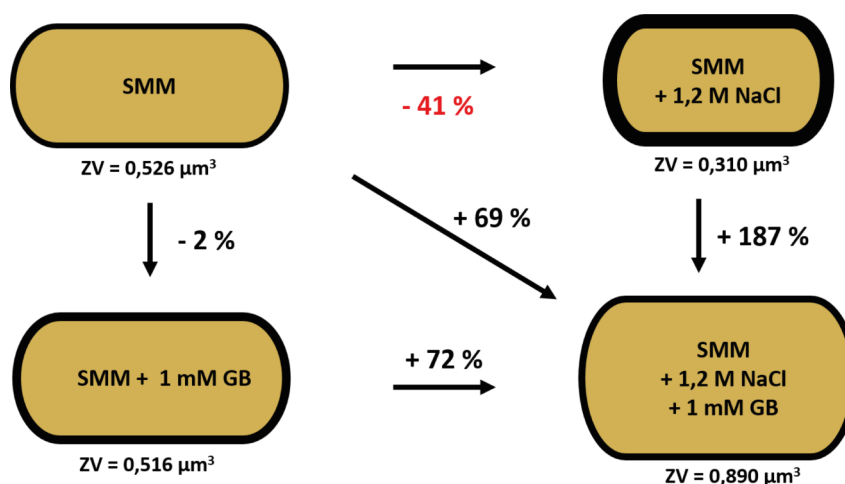


Abbildung 37: Schematische Darstellung der *B. subtilis* Zellen bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen. Für die Berechnung der Zytoplasmavolumina (ZV) wurden jeweils der Werte der 2. Parallele von REM und TEM genutzt (siehe Tab. 24 und Tab. 25). GB = Glycinbetain.

Insgesamt konnte mit den zwei Mikroskopie Techniken gezeigt werden, dass es für eine einzelne Zelle von großer Bedeutung ist, in welchem Medium sie sich befindet. Während sich in einer in SMM gewachsene Zelle zum Beispiel 100 mM einer Substanz befindet, wäre die Konzentration in einer Zelle, die sich an 1,2 M NaCl adaptiert hat, etwa bei 170 mM. Um die Werte an dieser Stelle mit den Daten von S. Moses, die das Zytoplasmavolumen für 1 mL $OD_{578} = 1$ bestimmt hat (siehe Tab. 27), vergleichen zu können, fehlt allerdings die Anzahl Zellen, die sich in diesem Volumen befindet. Es wurde bereits versucht, diese Zahl durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungen und Zählen der Kolonie bildenden Einheiten zu bestimmen (Daten nicht gezeigt, J. Gade & T. Hoffmann). Allerdings führte diese Methode zu großen Standardabweichungen bei allen Bedingungen und dadurch war die Abweichung zwischen den verschiedenen Bedingungen nicht signifikant. Anhand der Daten zum Zytoplasmavolumen dieser Arbeit müsste sich die Anzahl aber definitiv unterscheiden. Für Zellen, die mit 1,2 M NaCl und 1 mM Glycinbetain gewachsen sind, bräuchte es beispielsweise viel weniger für 1 mL $OD_{578} = 1$ als von denen, die nur mit 1,2 M NaCl gewachsen sind. Auch wenn das Volumen für 1,2 M NaCl durch S. Moses nicht bestimmt wurde, ist zumindest zwischen 0,6 M NaCl und 0,8 M NaCl ein Trend erkennbar, dass das Volumen mit zunehmender Salzkonzentration abnimmt.

Tabelle 27: Bestimmung des zytoplasmatischen Volumens für *B. subtilis* JH642 in 1 mL $OD_{578} = 1$. Daten aus der Dissertation von Moses, 1999

| Bedingung | Zytoplasmavolumen (μL / mL Kultur $OD_{578} = 1$) |
|-------------------------|--|
| SMM | 0,621 |
| SMM + 0,4 M NaCl | 0,686 |
| SMM + 0,6 M NaCl | 0,682 |
| SMM + 0,8 M NaCl | 0,599 |

Je nachdem wie gering der Wert für 1,2 M NaCl ist, spielt das für die Berechnung von Konzentrationen (zum Beispiel Prolin oder c-di-AMP), welche bisher immer mit dem Volumen 0,65 μL berechnet werden, höchstwahrscheinlich eine untergeordnete Rolle. Allerdings sollte bei solchen Berechnungen immer berücksichtigt werden, dass es lokal in einzelnen Zellen durch deren Größe zu wesentlich höheren Konzentrationen kommen kann.

6 Diskussion & Ausblick

B. subtilis ist durch seinen Lebensraum in den oberen Schichten des Bodens sich ständig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt. Das können Schwankungen in Nährstoffgehalt, Sauerstoffverfügbarkeit, Temperatur, pH-Wert sowie Feuchtigkeit und Trockenheit des Bodens sein (Mandic-Mulec et al., 2015). Sogenannte Second Messenger spielen bei der Reaktion auf die sich ändernden Umweltbedingungen innerhalb der Zelle eine wesentliche Rolle (Lodish et al., 2000; Kodis et al., 2012). Während die Nukleotid-basierten Second Messenger cAMP und c-di-GMP bereits sehr gut charakterisiert sind (Rall und Sutherland, 1958; Makman und Sutherland, 1965; Ross et al., 1987; Amikam und Benziman, 1989), hat die Forschung an c-di-AMP erst am Anfang dieses Jahrtausends begonnen (Witte et al., 2008; Corrigan und Gründling, 2013). c-di-AMP ist für viele Mikroorganismen ein *essenzielles Gift* unter Standardbedingungen, da sowohl das Fehlen als auch die Überakkumulation schädlich für die Zellen ist (Chaudhuri et al., 2009; Luo und Helmann, 2012; Whiteley et al., 2015). C-di-AMP konnte in *B. subtilis* bisher vor allem eine Rolle in der Kaliumhomöostase zugesprochen werden (Gundlach et al., 2017b). Kalium ist nicht nur das am häufigsten vorkommende Kation in der Zelle (Epstein, 2003; Bennett et al., 2009), sondern spielt auch eine wesentliche Rolle bei der Anpassung von *B. subtilis* an eine hyperosmotische Umgebung (Dinnbier et al., 1988; Csonka, 1989; Whatmore und Reed, 1990; Kempf und Bremer, 1998). In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern c-di-AMP auch beim zweiten Schritt der Anpassung an hyperosmotischen Stress, der Aufnahme von komptiblen Soluten, spielt.

6.1 Obwohl strukturell sehr ähnlich, bindet c-di-AMP nur an zwei der drei Opu CBS Domänen

Um kompatible Solute aus der Umgebung aufzunehmen besitzt *B. subtilis* fünf Transportsysteme, die sogenannten Opu Transporter (Bremer, 2000; Hoffmann und Bremer, 2017a). Drei davon (OpuA, OpuB und OpuC) gehören zur Familie der Substratbindprotein-abhängigen ABC Transportern, welche den Transport durch Spaltung von ATP ermöglichen (Kempf und Bremer, 1995; Davidson et al., 2008). Die Besonderheit der im Zytoplasma gelegenen Nukleotidbindedomäne ist die CBS Domäne am C-Terminus des Proteins. CBS Domänen sind regulatorische Untereinheiten von vielen Proteinen und fungiert zum Beispiel in OpuA von *L. lactis* als Sensor für die Ionenstärke im Zytoplasma (Biemans-Oldehinkel et al., 2006a; Biemans-Oldehinkel et al., 2006b). Auch die NBDs von OpuA, OpuB und OpuC in *B. subtilis* besitzen jeweils CBS Domänen am C-Terminus. In den homologen OpuC Systemen in *L. monocytogenes* und *S. aureus* konnte gezeigt werden, dass der Second Messenger c-di-AMP an die CBS Domäne von OpuC bindet (Huynh et al., 2016b; Schuster et al., 2016). Eine Berechnung der Sequenzidentität sowie ein Homologie-Modelling mittels Swiss-Model zeigte, dass aufgrund der Ähnlichkeit vor allem zwischen den CBS Domänen von *B. subtilis* OpuBA und OpuCA und CBS-CA aus *L. monocytogenes* auch eine Bindung von c-di-AMP an die *B. subtilis* CBS Domänen möglich sein könnte. Aber auch CBS-AA aus *B. subtilis* könnte von der Struktur her c-di-AMP binden. Um diese Hypothese zu überprüfen, erfolgte zunächst die Klonierung der jeweiligen NBDs und CBS Domänen für eine heterologe Expression in *E. coli*. Alle Proteine, welche mit

einem *Strep*-Tag fusioniert waren, erwiesen sich letztendlich als unlöslich. Interessanterweise war im Falle von CBS-CA aus *L. monocytogenes* und *S. aureus* die Expression der reinen CBS Domäne ohne ATPase Domäne ohne weiteres mittels His-Tag möglich. Die Expression und Reinigung der kompletten NBD erfolgte mittels einer Fusion an das Maltosebindeprotein von *E. coli* (Huynh et al., 2016b; Schuster et al., 2016). Ein Problem könnte an der Stelle sein, dass sich die NBDs sehr nah an der Zytoplasmamembran befinden und damit eher eine hydrophobe Oberfläche aufweisen. Das MBP erhöht durch seine Struktur die Löslichkeit vieler Proteine (Kapust und Waugh, 1999). Aus diesem Grund erfolgte in einem zweiten Schritt der Test von MBP-Fusionen für alle Proteine (CBS Domänen und komplette ATPase Domänen). Das MBP erwies sich auch hier als eine gute Lösung für die Reinigung. Interessanterweise gab es aber Unterschiede zwischen den NBDs. Während sich OpuAA wie bereits in vorangegangenen Studien problemlos reinigen lies (Horn et al., 2003; Horn et al., 2008), gab es bei OpuBA und OpuCA auf dem SDS Gel immer mehrere Banden, welche auf einen Abbau hindeuteten. Dieses Problem konnte auch mit der zusätzlichen Nutzung von Protease-Inhibitoren nicht behoben werden.

Da an dieser Stelle die drei CBS Domänen in ausreichender Konzentration löslich vorlagen, wurde für die biochemische Analyse mit diesen Konstrukten weitergearbeitet. Wie bereits weiter oben erwähnt, ist es von der Struktur her für CBS-AA, BA und CA möglich, dass c-di-AMP bindet. In einem ersten Experiment wurde diese Theorie mittels Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS) überprüft (siehe 5.4.2). Es zeigte sich nur eine Bindung für CBS-BA und CA, nicht jedoch für CBS-AA. Eine Analyse der einzelnen Peptide ergab, dass c-di-AMP von CBS-CA höchstwahrscheinlich mit höherer Affinität gebunden wird, als von CBS-BA. Vergleicht man die Sequenzen von beiden Proteinen, ähnelt sich die Art der Aminosäuren in der Bindetasche, Unterschiede gibt es vor allem in Bereichen, die sich an der Außenseite der Proteine befinden. Von der Seite gibt es daher keine Erklärung dafür, warum CBS-CA zu c-di-AMP eine bessere Affinität haben sollte als CBS-BA.

Dieses Ergebnis konnte durch *Microscale Thermophoresis* (MST) bestätigt werden. Auch dass c-di-AMP nicht an CBS-AA bindet, wurde bestätigt. Mittels MST wurde die Affinität in Form der Dissoziationskonstante für die beiden c-di-AMP-bindenden Proteine bestimmt: Für CBS-BA lag diese in etwa bei 15 μM und für CBS-CA bei 8 μM . Allerdings ist dieser Unterschied für die Zelle nicht gravierend, wenn man sich die Situation *in vivo* vorstellt. Damit c-di-AMP an die beiden CBS-Domänen bindet, müsste die Zelle in der Umgebung der Transporter in etwa die gleiche c-di-AMP Konzentration einstellen. Interessanterweise wurde parallel zu dieser Arbeit von einer anderen Forschungsgruppe ein ähnliches Experiment mit den NBDs OpuBA und OpuCA durchgeführt. Diese wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und die Bindung durch die Inkubation des Zellextrakts mit c-di-AMP getestet (Gundlach et al., 2019). Im Gegensatz zu dieser Arbeit kam heraus, dass c-di-AMP nur an OpuCA bindet, jedoch nicht an OpuBA. Allerdings wirft die Nutzung von kompletten Zellextrakten die Frage auf, inwiefern möglicherweise noch andere Komponenten aus *E. coli* die Faltung der Proteine und damit die Bindung beeinflusst haben.

Warum an die CBS Domäne von OpuAA kein c-di-AMP bindet, ist auch von der Struktur her nicht einfach zu erklären. OpuB und OpuC sind sich sehr ähnlich und OpuB ist vermutlich

aus einer Genduplikation von OpuC entstanden (Kappes et al., 1999; Teichmann et al., 2018). Allerdings ist OpuA in *B. subtilis* das Haupt-Aufnahmesystem für das am weitesten verbreitete kompatible Solut Glycinbetain. Obwohl alle Glycinbetain Transporter in *B. subtilis* (OpuA, OpuC und OpuD) ähnliche Affinitäten zum Substrat im mikromolaren Bereich zeigen, hebt sich OpuA mit höherer Maximalgeschwindigkeit deutlich von den anderen beiden ab (Kempf und Bremer, 1995; Kappes et al., 1996). Daher ist es verwunderlich, dass c-di-AMP für die Regulation des Transporters an CBS-CA bindet, jedoch nicht an CBS-AA. Die Tatsache, dass die CBS Domäne an OpuAA existiert, deutet zumindest darauf hin, dass durch Bindung eines Komponenten an selbige der Transporter reguliert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht detektiert, ob eventuell ein anderer Second Messenger an CBS-AA bindet. Es konnte nur gezeigt werden, dass es c-di-GMP, welches dem c-di-AMP sehr ähnlich ist, nicht ist. Möglicherweise liegt das Problem bei der nicht korrekten Faltung des Proteins. Daher ist es die Aufgabe von zukünftigen Experimenten, diese Möglichkeit zu überprüfen und damit den Bindungspartner zu identifizieren.

6.2 Einige Aminosäuren von CBS-BA sind essenziell für die Bindung an c-di-AMP

Um die Bindung zwischen c-di-AMP und der CBS Domäne von OpuBA weiter zu charakterisieren, wurden in Folgeexperimenten verschiedene Mutationen in das Protein eingebracht. Die zu mutierenden Aminosäuren befanden sich zum einen direkt in der Bindetasche und zum anderen in dem Bereich, in denen die Dimerisierung der CBS Domänen der beiden NBDs stattfindet. Die Mutationen wurden vor allem in den in homologen CBS Domänen konservierten Bereichen vorgenommen oder an Stellen, wo sich CBS-AA von den anderen beiden CBS Domänen unterscheidet. Für letzteres erfolgten Mutationen von Valin261 zu Glutamat und von Lysin342/Tyrosin343 zu Prolin. Obwohl die Interaktion zwischen c-di-AMP und V261 am N-Atom im Backbone der Aminosäure stattfindet, konnte durch die Mutation zu Glutamat die Bindung vollkommen verhindert werden. Das liegt zum einen an der Länge von Glutamat als auch an den zwei zusätzlichen negativen Ladungen, welche durch die Mutation eingefügt wurden. Obwohl die umliegenden Aminosäuren in CBS-AA und CBS-BA unterschiedlich sind, könnte das Glutamat an dieser Stelle dafür sorgen, dass CBS-AA generell kein c-di-AMP binden kann. Die Mutation von Lysin342/Tyrosin343 zu Prolin stellt eine Besonderheit da, da hier zwei Aminosäuren herausgenommen und nur eine wieder inseriert wurde. Diese Veränderung allein führt schon dazu, dass die Bindetasche an dieser Stelle „enger“ ist und das Protein zusammengezogen wird. Dadurch ändert sich auch die Orientierung einiger umliegender Aminosäuren (siehe Abb. 23, **A** und **B**, Seite 68). Zudem wurde durch die Mutation der aromatische Ring von Tyrosin und die positive Ladung des Lysins entfernt, welche beide eine Rolle spielen für die Bindung an c-di-AMP. Deswegen war nicht verwunderlich, warum bei dieser Mutante keine Bindung mehr detektiert werden konnte. Allerdings muss bedacht werden, dass diese Veränderung vermutlich die Faltung des Proteins negativ beeinflusst. Für Folgeexperimente wäre es außerdem interessant, ob man vielleicht durch die umgekehrte Mutation von CBS-AA eine Bindung zu c-di-AMP erzeugen kann. Eventuell wäre auch eine Doppelmutante mit dem Valin261 eine Option. Allerdings ist nicht vorhersagbar ob eventuell noch andere Aminosäuren in CBS-

AA die Bindung an c-di-AMP verhindern.

Für Tyrosin343 sollte außerdem getestet werden, ob der aromatische Ring an sich für die Bindung von Bedeutung ist oder ob es genau Tyrosin sein muss mit OH-Gruppe. Zu diesem Zweck erfolgten die Mutationen zu Phenylalanin, Tryptophan und Alanin. Da Tyrosin keine direkte Bindung mit c-di-AMP eingeht, war die Vermutung, dass der aromatische Ring an der Stelle ausreicht. Diese Vermutung konnte auch insofern bestätigt werden, als dass die Mutation zu Phenylalanin eine Affinität ähnlich dem Wildtyp lieferte, allerdings Mutationen zu Tryptophan mit Doppelringsystem und Alanin ohne aromatischen Ring ausreichte um die Bindung zu verhindern. Damit konnte gezeigt werden, dass ein einfacher Aromat vermutlich für die richtige Koordination von c-di-AMP sorgt, ohne direkt eine Bindung einzugehen. Für das homologe System aus *L. monocytogenes* lieferte die Mutation an der Stelle zu Alanin noch eine Bindung zu c-di-AMP wenn auch eine schlechtere (Huynh et al., 2016b). In dem Falle wurde die Mutation auch *in vivo* getestet in einem Stamm, der c-di-AMP überakkumuliert, da der Abbau verhindert wird. Das Ergebnis zeigte eine schlechtere Aufnahme des kompatiblen Soluts Carnitin im Vergleich zum Wildtyp. Nimmt man die Hypothese an, dass die Bindung von c-di-AMP den Transporter abschaltet, wäre diese durch die Mutation von Tyrosin343 zu Alanin wiederlegt.

Ähnliche Effekte gab es auch bei Lysin342. Während dieser Arbeit erfolgte die Mutation zu Glutamat um durch einen Ladungsaustausch die Bindung zu verhindern. Überraschenderweise hat diese Mutante mit einer Affinität ähnlich zum Wildtyp gebunden. Theoretisch müssten sich die negativen Ladungen des Glutamats mit den negativen Ladungen des gegenüberliegenden Aspartats abstoßen. Allerdings wäre es denkbar, dass sich das Glutamat in eine andere Richtung neigt und mit anderen positiv geladenen Aminosäuren die Bindung zu c-di-AMP stabilisiert. Für *Lm* CBS-CA wurde durch die Mutation zu Alanin die Ladung generell entfernt. Interessanterweise lieferte das eine bessere Bindung zu c-di-AMP. *In vivo* zeigte sich dann wie erhofft ein schlechterer Transport von Carnitin. Allerdings ist die Mutation vom gegenüberliegenden Aspartat zu Alanin wieder ein Gegenbeispiel zur allgemeinen Hypothese: *In vitro* konnte keine Bindung mehr detektiert werden, allerdings wurde auch keinerlei Carnitin mehr aufgenommen (Huynh et al., 2016b). Interessant ist an der Stelle, dass Einzelmutationen zu Alanin auf beiden Seiten der Wasserstoffbrücke komplett unterschiedliche Ergebnisse liefern, und dass eine entgegengesetzte Ladung nicht unbedingt die Bindung verhindert. Insgesamt wird dadurch gezeigt, dass es für eine Bindung auf das gesamte Protein ankommt und sich durch einzelne Mutationen ganz neue Situationen ergeben können, welche überraschende Ergebnisse liefern.

Ein weiteres interessantes Resultat zeigte eine Mutation, welche die Bildung des CBS Dimers bestehend aus den CBS Domänen der beiden NBDs verhindern sollte. Zwischen Aspartat364 des einen Monomers wird im Wildtyp eine Salzbrücke zum Arginin280 des anderen Monomers gebildet. Die Mutation von Aspartat364 zu Lysin zeigte sehr überraschend eine ungefähr um den Faktor Drei bessere Affinität als der Wildtyp. Auch hier müssten sich die positiven Ladungen nach der Mutation theoretisch abstoßen. Wie bereits unter 5.4.4 angedeutet, zeigt sich hier eine vorher noch nicht genauer betrachtete Problematik bei der Messung der Affinität zwischen den CBS Domänen und c-di-AMP. Bisher konnte der Mechanismus der Bindung noch nicht

aufgeklärt werden. Anhand der Struktur ist denkbar, dass c-di-AMP zunächst an das eine Monomer bindet und das andere Monomer anschließend hinzukommt und dadurch die Bindung festmacht. Dafür wäre die Theorie für oben genannte Mutation folgende: Die entgegengesetzte Ladung des Lysins führt wirklich dazu, dass das zweite Monomer „weggestoßen“ wird. Möglicherweise liegen die Bindestellen der einzelnen Monomere jetzt nicht mehr so dicht beieinander und erleichtern die Bindung von c-di-AMP an das Monomer, was sich in einer besseren Affinität äußert. Sollte der Mechanismus eher wie das Zupacken mit einer Zange funktionieren, also beide Monomere gleichzeitig an c-di-AMP binden, sollte wie ursprünglich gedacht, D346K gar keine Bindung mehr detektierbar sein oder eine schlechtere.

Um solche Mutanten besser auswerten zu können, ist es von großer Bedeutung aufzuklären, wie die Bindung von c-di-AMP an die CBS Domänen funktioniert. Für diese Arbeit konnten mittels der Bestimmung der Dissoziationskonstanten von CBS Mutanten zum einen gezeigt werden, dass es offensichtlich Aminosäuren gibt, welche essenziell sind für die Bindung. Zum anderen sind damit gute Voraussetzungen geschaffen um durch einen *in vivo* Test der Mutanten die Hypothese, dass die Bindung von c-di-AMP den Transporter abschaltet, bestätigen oder widerlegen zu können.

6.3 Das experimentelle Setup für die *in vivo* Analyse der CBS Domänen ist von besonderer Bedeutung

Wie bei anderen Analysen von Opu Transportern üblich, wurde in einem ersten Schritt ein Osmoprotektionsassay von allen *in vitro* analysierten Mutanten durchgeführt. Hierfür erfolgte die Kultivierung unter Hochsalzbedingungen (1,2 M NaCl) ohne und mit Zugabe des kompatiblen Solut Cholin. Um das Wachstum zu vergleichen, erfolgte eine OD-Messung nach 16 Stunden Wachstum. Zwischen den Mutanten und dem Wildtyp Transporter OpuB gab es kaum Unterschiede (siehe Abb. 26, Seite 70). An dieser Stelle wurde somit die Anpassung nach mehreren Stunden gemessen. Womöglich werden Unterschiede erst deutlich, wenn man die Aufnahme von kompatiblen Soluten direkt nach der Zugabe misst. Bedenkt man die Theorie, dass c-di-AMP die Transporter abschaltet, sollten sich Unterschiede in der Aufnahme aber auch da erst nach einer gewissen Zeit ergeben. An der Stelle, wo die Zelle genug kompatibles Solut aufgenommen hat, wird der Transport abgebrochen. Theoretisch müsste in den Transportern, wo c-di-AMP nicht mehr bindet, der Transport weiter funktionieren. Umgekehrt könnte es sein, dass Mutanten, die c-di-AMP besser binden, den Transport früher abschalten als der Wildtyp oder je nach c-di-AMP Konzentration c-di-AMP direkt bindet und den Transport verhindert.

Ein Experiment in dieser Art und Weise wurde für die *in vivo* Analyse der Mutanten in *L. monocytogenes* durchgeführt (Huynh et al., 2016b): Um möglichst viel c-di-AMP in den Zellen zu haben, wurde ein Stamm verwendet, welcher durch die Deletion beider Phosphodiesterasen kein c-di-AMP mehr abbauen kann. Zu den Zellen wurde radioaktiv markiertes Carnitin gegeben und die Radioaktivität in den Zellen nach 5; 10; 20 und 30 Minuten gemessen (siehe Abb. 38, Seite 95). Bei genau zwei Mutanten konnte die Theorie bestätigt werden: R279A (orange) bindet kaum noch c-di-AMP, der Transport geht aber von Anfang an schneller als der Wildtyp. Umgekehrt bindet K341A (blau) besser c-di-AMP, was den Transport von Anfang an verhindert. Bei den übrigen drei Mutanten funktioniert der Transport hingegen von Anfang an schlechter

oder gar nicht mehr, obwohl kein c-di-AMP mehr bindet. Das könnte daran liegen, dass die Mutation die Faltung des Proteins so beeinflusst hat, dass eventuell auch die ATPase mit beeinflusst wurde und nicht mehr funktionell ist. Die R279A Mutante ist insofern interessant, als dass der Transport allgemein besser funktioniert, er aber trotzdem in die Sättigung übergeht. Das heißt, auch wenn kein c-di-AMP mehr bindet, geht der Transport nicht unendlich weiter. Vermutlich ist aber an der Stelle einfach das Substrat Carnitin nicht mehr verfügbar.

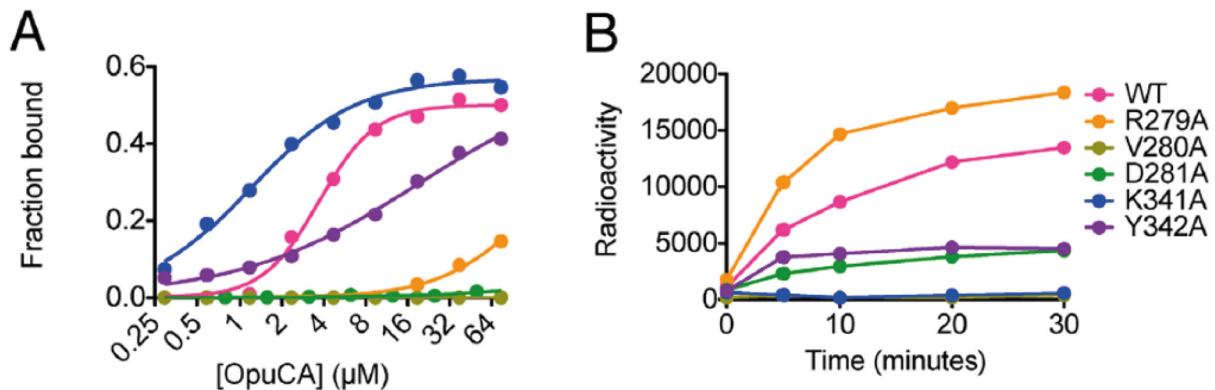


Abbildung 38: Zusammenhang zwischen der Bindung von c-di-AMP und der Transporterfunktion von *L. monocytogenes* OpuCA. (A) Ergebnis der Affinitätsstudien zwischen OpuCA Mutanten und c-di-AMP mittels DRaCALA Assay. (B) Aufnahme von radioaktiv markiertem Carnitin über die Zeit in Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase. OpuCA Mutanten in einem Stamm, der kein c-di-AMP mehr abbauen kann. Abbildungen aus Huynh et al., 2016b.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein solches Experiment nicht durchgeführt. Allerdings wurde neben den CBS Mutanten auch *in vivo* getestet, was passiert, wenn keine CBS Domänen mehr vorhanden sind. Diese Stämme wurden für OpuB und OpuC konstruiert und das Wachstum mit verschiedenen Cholinkonzentrationen im Mikrotiterplattenphotometer verfolgt um auch Unterschiede wahrnehmen zu können, welche bei Osmoprotektionsassays nicht sichtbar werden. Erstaunlicherweise zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen den Transportern mit und ohne CBS Domäne (siehe Abb. 27, Seite 72). Die Stämme mit den Transportern ohne CBS Domäne wuchsen mit 1,2 M NaCl generell schlechter, aber auch ohne Cholin gab es diesen Effekt. Daher ist dieser Effekt wahrscheinlich nicht auf das Fehlen der CBS Domäne zurück zu führen. Für *L. monocytogenes* wurde ein derartiges Experiment nicht durchgeführt, jedoch für OpuC aus *P. syringae* (Chen und Beattie, 2007): Hier führte schon die Entfernung von CBS2 dazu, dass sich ein Stamm nicht mehr protektieren lies. Allerdings ist auch das Ergebnis interessant, denn das würde bedeuten, dass die CBS Domäne für dieses System (zusätzlich) eine andere Aufgabe hat, als bei Bindung eines Liganden den Transporter abzuschalten. Das könnte zum Beispiel die Funktion eines Ionensensors wie für *L. lactis* sein, welcher Änderungen in der Ionenstärke an die ATPase weitergibt (Karasawa et al., 2011; Karasawa et al., 2013). Alternativ wurde durch die Deletion der CBS2 von OpuC aus *P. syringae* die Faltung der NBD ganz allgemein beeinflusst, sodass dadurch der Transporter inaktiv war. Dass beide Transporter aus *B. subtilis* auch ohne CBS Domäne für eine Osmoprotektion sorgen, deutet aber darauf hin, dass die CBS Domäne in diesem Fall nicht essenziell ist um den Transporter funktionstüchtig zu halten.

Das Phänomen, dass es sowohl bei den CBS Mutanten in der Osmoprotektion als auch beim Wachstum mit OpuB oder OpuC ohne CBS Domäne keinerlei veränderten Phänotyp gab, welcher auf das Fehlen der CBS Domänen zurückzuführen ist, könnte verschiedene Ursachen haben:

(I) Eventuell spielt das Schließen des Transporters bei kontinuierlichem Wachstum unter osmotisch bedingtem Stress eher eine untergeordnete Rolle. Das würde bedeuten, dass die Zelle über die Zeit einen anderen Weg findet um sich ohne Überakkumulation von kompatiblen Soluten an die Stress-Situation anzupassen. Für diesen Fall müsste überprüft werden, wie sich die Mutanten verhalten, wenn man während des Wachstums auf einmal eine größere Menge Salz zum Medium hinzugibt. Für eine genauere Analyse müssten in zukünftigen Experimenten auch die Pools von Glycinbetain in den *B. subtilis* Zellen als auch die Kinetik der mutierten Transporter untersucht werden.

(II) Eventuell wurden mit der Nutzung des Standard-Minimalmediums für *B. subtilis* noch keine Bedingungen hervorgerufen, wo das Nicht-Binden von c-di-AMP einen Einfluss auf die Funktion des Transporters hat. Eine Analyse des standardmäßig genutzten Minimalmediums SMM während dieser Arbeit warf die Frage auf, inwiefern hohe Kaliumkonzentrationen im Medium ein Problem darstellen könnten. In vorherigen Analysen wurde gezeigt, dass wenig Kalium in der Zelle zu geringen c-di-AMP Konzentrationen führt und viel Kalium die c-di-AMP Synthese stimuliert. Nach dieser Theorie müssten bei Wachstum in SMM mit 125 mM Kalium viel c-di-AMP vorhanden und der Transport dauerhaft reduziert sein. Des Weiteren kam bei Analysen der Kaliumhomöostase in *B. subtilis* heraus, dass c-di-AMP auf alle Kaliumimporte einen Einfluss hat, sowohl auf transkriptioneller Ebene durch Interaktionen mit der DNA als auch auf Aktivitätsebene durch Interaktion mit den Transportern selbst (Holtmann et al., 2003; Gundlach et al., 2017a; Gundlach et al., 2017b; Rocha et al., 2019).

Die schnelle Kaliumaufnahme, aber auch das Verhindern eines zu hohen Kaliumpools sind essenzielle Schritte für *B. subtilis*, um sich zum an hohe externe Osmolarität anzupassen (Dinnbier et al., 1988; Csonka, 1989; Whatmore und Reed, 1990; Kempf und Bremer, 1998). In SMM (mit 125 mM Kalium) funktioniert diese Anpassung optimal, da im Medium ausreichend Kalium zur Verfügung steht. In Wachstumsversuchen mit Medien mit definiert geringer Kaliumkonzentration (10, 5 und 1 mM) zeigte sich schon, dass diese Limitation auf die Osmotressantwort einen großen Einfluss hat: Ersetzt man Kalium in SMM durch Natrium, setzt kleine Kalium-Mengen ein und lässt sonst alle Komponenten gleich, ist ein Wachstum unter Hochsalzbedingungen (1,2 M NaCl) nicht mehr möglich. Einzig das Austauschen der Stickstoffquelle von Ammoniumsulfat zu Glutamat machte ein sogar noch besseres Wachstum möglich. An dieser Stelle kommt allerdings der zweite Schritt der Osmoadaption zum Tragen, die Synthese von Prolin als Osmoprotektivum aus dem Vorläufer Glutamat (Brill et al., 2011a; Hoffmann et al., 2013). Das verbesserte Wachstum zeigt, dass die erhöhte Produktion von Prolin als Osmoprotektivum ausreicht um geringe Kaliumkonzentrationen im Medium zu kompensieren. Die Zugabe von Glycinbetain zum Medium führt normalerweise dazu, dass statt *de novo* Synthese von Prolin, Glycinbetain als Osmoprotektivum aufgenommen wird (siehe Abb. 3, **B**, Seite 18) (Hoffmann et al., 2013). In der Prolinbestimmung für das Medium mit wenig Kalium und Glutamat als Stickstoffquelle zeigte sich, dass in dem Falle der Prolinpool nicht wieder auf das

Level in ungestressten Zellen gebracht werden konnte (siehe Abb. 29, Seite 76).

Um diesen zusätzlichen osmoprotektiven Effekt bei der Analyse der CBS Domänen zu umgehen, wurde nach einer anderen Stickstoffquelle gesucht, welche das Wachstum bei 1,2 M NaCl erlaubt. Allerdings war diese Suche nicht erfolgreich. Somit wurde entschieden, die Tests in einem Stamm durchzuführen, in dem die osmoadaptive Prolinsynthese durch die Deletion des *proHJ* Operons ausgeschaltet ist. Allgemein ist bekannt, dass diese Stämme im Allgemeinen schon einen osmosensitiven Phänotyp zeigen (Brill et al., 2011a). Im Test mit niedrigen Kaliumkonzentrationen konnte nur 5 mM KCl zu einem Wachstum bis zu einer OD₅₇₈ von über 1,0 verhelfen, allerdings dauerte das über 40 Stunden (siehe Abb. 30, Seite 77).

Da zumindest überhaupt ein Wachstum möglich war, erfolgte zunächst ein Test der Opu Transporter A, OpuB, OpuC und OpuD im Allgemeinen. Es konnte gezeigt werden, dass diese ihre Substrate passend zu ihren Substratspektren transportieren. Allerdings fiel an der Stelle schon auf, dass das Wachstum bei 1,2 M NaCl generell sehr heterogen war. Zusätzlich gab es noch Effekte, welche vom Standard Minimalmedium SMM so nicht bekannt waren: (I) Ohne Salzstress gab es generell einen „Knick“ in der Wachstumskurve. Die Zellen hörten mitten in der exponentiellen Wachstumsphase für mehrere Stunden auf zu wachsen und im Anschluss daran ging das exponentielle Wachstum weiter. (II) Wenn auch in den Abbildungen dieser Arbeit nicht zu sehen, kam es bei vielen Kulturen zu dem Phänomen, dass sie kurz nach dem Eintritt in die stationäre Phase recht schnell in die Absterbephase übergingen. An dieser Stelle muss es irgendwas geben, was toxisch oder für das Überleben der Zellen limitierend ist. Eine mögliche Ursache ist die hohe Natriumkonzentration im Medium. Durch Verwendung von Natriumphosphatpuffer, Natrium-Glutamat und 1,2 NaCl ist die Konzentration insgesamt ziemlich hoch. Na-Glutamat wird über den Transporter GltT auch direkt in die Zelle aufgenommen (Zaprasis et al., 2015). In hohen Konzentrationen ist Natrium toxisch und drei von vier Natrium Exportsystemen in *B. subtilis* sind osmotisch induziert (Hahne et al., 2010; Górecki et al., 2014). Möglicherweise ist der Export von Natrium in dem Medium gestört oder es wird kein Natrium-Glutamat mehr aufgenommen um sich vor toxischen Natrium-Konzentrationen zu schützen.

Die eben genannten Phänomene traten im Anschluss an die Tests der Transporter allgemein auch mit den Stämmen auf, in denen die CBS Domäne deletiert wurde (Daten nicht gezeigt). Die Transporter mit den Einzelmutationen wurden daraufhin nicht weiter getestet. Aus allen durchgeführten Experimenten geht im Endeffekt hervor: Das optimale Setup um die *in vivo* Funktion von c-di-AMP im Zusammenhang mit den CBS Domänen zu testen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden. Die Tatsache, dass es die CBS Domänen gibt, dass c-di-AMP *in vitro* daran bindet und es Mutanten gibt, die kein c-di-AMP mehr binden, muss auch *in vivo* einen Effekt haben. Allerdings konnten bisher noch keine Transportassays mit radioaktiv markierten kompatiblen Soluten durchgeführt werden, analog zu *L. monocytogens*. Wie bereits weiter oben angedeutet ist es auch möglich, dass c-di-AMP die Transporter nur bei einem Salzschock abschaltet und bei kontinuierlichem Wachstum keine Rolle spielt. Auch das muss in zukünftigen Experimenten überprüft werden.

6.4 c-di-AMP Konzentrationen in der *B. subtilis* Zelle - ein kritischer Punkt in Hinblick auf c-di-AMP bindende Zellkomponenten

Für ein komplettes Bild über die Regulation der Opu Transporter durch c-di-AMP wurde in einem weiteren Teil der Arbeit die intrazelluläre Konzentration von c-di-AMP bestimmt. Nach umfangreicher Analyse der Literatur gab es nur eine Bestimmung aus *B. subtilis*, welche als Anhaltspunkt genommen werden konnte. Diese wurde in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration im Medium durchgeführt und ergab Werte von 20 ng c-di-AMP / mg Protein (1 mM KCl) und 40 ng c-di-AMP / mg Protein (5 mM KCl). Während dieser Arbeit bei einer Bestimmung in SMM ergab sich ein Wert von ungefähr 4,5 μ M, was in etwa 12 ng c-di-AMP/mg Protein entspricht. Damit liegen beide Bestimmungen in etwa im selben Bereich. Allerdings muss beachtet werden, dass die Zellen in den beiden Experimenten während unterschiedlichen Wachstumsphasen geerntet wurden, bei Gundlach et al., 2017b in der Mitte und in dieser Arbeit am Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Interessanterweise führte osmotisch bedingter Stress zu keiner Änderung der c-di-AMP Konzentration. Erwartet wurde, dass unter den Bedingungen durch die Regulation der Kaliumtransporter die Konzentration ansteigen müsste. Da kein kompatibles Solut eingesetzt wurde, fehlt an dieser Stelle die mögliche Regulation der Opu Transporter. Wie bereits im betreffenden Kapitel (5.6.2) angedeutet, gibt es die Möglichkeit, dass bei Salzstress sich die c-di-AMP Konzentration nicht in der gesamten Zelle erhöht, sondern lokale c-di-AMP Pools dafür sorgen könnten, dass c-di-AMP an den *ydaO* Riboswitch oder die Kaliumtransporter binden kann. Dieses Phänomen konnte bereits für c-di-GMP in *E. coli* gezeigt werden (Sarenko et al., 2017; Richter et al., 2020). Im Prinzip könnte die membranständige Diadenylatzyklase CdaA die Funktion für die Kaliumtransporter übernehmen und DisA, welche an der DNA agiert, den Riboswitch bedienen. Allerdings muss auch beachtet werden, dass bei einer OD₅₇₈ von 1,5 die Adaption an den Salzstress schon über ungefähr 4 Generationen passiert ist und das eventuell anfänglich erhöhte c-di-AMP Level schon wieder gesenkt wurde. Um diese Frage zu beantworten, müsste man die c-di-AMP Konzentrationen über alle Wachstumsphasen hinweg bestimmen.

6.4.1 Bedeutung der c-di-AMP Konzentrationen für die Regulation von Kaliumhomöostase und Aufnahme kompatibler Solute

Alle gemessenen c-di-AMP Konzentrationen aus dieser Arbeit sowie die aus den vorigen Experimenten in *B. subtilis* 168 lagen im niederen mikromolaren Bereich. Damit stellen sich einige Fragen für die Regulation von Kaliumhomöostase und der Aufnahme kompatibler Solute. Tabelle 28 zeigt eine Aufstellung von Dissoziationskonstanten, die bereits für verschiedenen Komponenten, welche c-di-AMP Targets in *B. subtilis* sind, gemessen wurden. Besonders interessant sind die Werte, welche sich im nanomolaren Bereich befinden (*ydaO* Riboswitch und KtrC). Sollte c-di-AMP in der Zelle im Allgemeinen wirklich in mikromolarer Konzentration vorliegen, würde das bedeuten, dass sowohl der Riboswitch als auch KtrC durchgängig gebunden an c-di-AMP vorliegen würden. Da *ydaO* ein sogenannter *Off-Switch* ist, führt die Bindung von c-di-AMP damit zur dauerhaften Blockierung der Transkription der dahinterliegenden Gene *kimA*

bzw. *ktrAB*. Die dauerhafte Bindung von c-di-AMP an die RCK-C Domäne von KtrC bedeutet auch, dass der Kaliumtransporter KtrCD ständig ausgeschaltet wäre.

Tabelle 28: Gemessene Dissoziationskonstanten für verschiedene c-di-AMP Targets in *B. subtilis*. ITC = Isothermale Titrationskalorimetrie. MST = *MicroScale Thermophoresis*.

| c-di-AMP Target | Dissoziationskonstante (K_D) | Methode | Referenz |
|------------------------|--|------------|------------------------|
| <i>ydaO</i> Riboswitch | $41,7 \pm 16,7$ nM ^(A) $7,4 \pm 2,2$ nM ^(B) | ITC ITC | Gao und Serganov, 2014 |
| KtrC KtrA | 30 nM 3000 nM | ITC ITC | Rocha et al., 2019 |
| CBS-BA CBS-CA | 14990 ± 1900 nM 7790 ± 1100 nM | MST MST | Diese Arbeit |

^(A) 20 mM Mg²⁺ ^(B) 5 mM Mg²⁺

Für die gesamte Kaliumhomöostase würden c-di-AMP Konzentrationen im mikromolaren Bereich bedeuten, dass keiner der Kaliumtransporter überhaupt aktiv wäre. Lokal könnte hier durch die membranständigen Phosphodiesterasen PgpH und GdpP das c-di-AMP Level gesenkt werden. Das wäre zumindest die Idee für die Regulation von KtrC. Für den Riboswitch ist das schon komplizierter, da könnte nur eine geringere Aktivität von DisA regulierend wirken. Damit bleibt am Ende allerdings die Frage offen, warum die Konzentrationen in der Zelle bei osmotischem Stress so weit oben sind, dass alle Komponenten der Kaliumhomöostase inaktiv wären. Für die Regulation der CBS Domänen wäre es hingegen durchaus vorstellbar, dass die Konzentrationen im niederen mikromolaren Bereich liegen. Hier kommt wiederum die Idee zum Tragen, dass es in der Zelle lokal zu erhöhten Konzentrationen kommen könnte, um beispielsweise genug c-di-AMP für das Abschalten der Opu Transporter bereit zu stellen.

6.5 Ein verringerte c-di-AMP Konzentration hat keinen (sichtbaren) Einfluss auf die Osmoadaption

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, inwiefern sich ein verändertes c-di-AMP Level auf die Regulation der Opu Transporter und damit die Osmostressantwort auswirkt. Um die Konzentration zu erhöhen, könnte man ähnlich wie in *L. monocytogens* die c-di-AMP abbauenden Enzyme deletieren. Allerdings war die Doppeldeletion von *gdpP* und *pgpH* in vorangegangenen Experimenten bisher nicht erfolgreich. Die Konstruktion dieser Doppelmutante führte zu lysierten Zellen und es wurden Suppressoren gefunden, welche die Aktivität von CdaA negativ beeinflussten (Gundlach et al., 2015). Damit zeigt sich in dem Beispiel, dass erhöhte c-di-AMP Level toxisch für die Zelle sind.

Umgekehrt ist es möglich, unter bestimmten Voraussetzungen die Dreifachmutante von allen Diadenylylatzyklen zu erstellen. Da c-di-AMP in *B. subtilis* essenziell ist um die Kaliumaufnahme zu regulieren, ist eine Konstruktion nur mit sehr geringen Kaliumkonzentrationen bis zu 0,1 mM möglich. Höhere Konzentrationen führen auch hier zu Suppressoren, in dem Fal-

le im Natrium/Kalium Exporter NhaK, welcher dadurch einen besseren Export von Kalium erlaubt (Gundlach et al., 2017b). Interessanterweise können auch nicht alle Doppelmutanten unter Standardbedingungen konstruiert werden. Da sowohl DisA als auch CdaA während des exponentiellen Wachstums aktiv sind, kann diese Doppelmutante ebenfalls nur mit 0,1 mM Kalium im Medium erstellt werden. Da CdaS speziell während der Sporulation aktiv ist, sind die Doppelmutanten $\Delta cdaS \Delta disA$ bzw. $\Delta cdaS \Delta cdaA$ problemlos möglich. Während dieser Arbeit wurde versucht alle Varianten von Einzel-, Doppel- und die Dreifachmutante zu erstellen. Trotz Nutzung von Medien mit maximal 0,1 mM KCl analog zum Protokoll in Gundlach et al., 2017b, scheiterten die Konstruktionen der kritischen Doppelmutante und der Dreifachmutante. Um mit den anderen Mutanten weiterzuarbeiten, erfolgte zunächst die Bestimmung der c-di-AMP Konzentration sowohl ohne Salzstress als auch bei Wachstum mit 1,2 M NaCl (siehe Abb. 33, Seite 83). Schon ohne Salzstress zeigte sich ein unerwartetes Bild. Die Messungen in den Einzelmutanten deuteten zunächst darauf hin, dass das Fehlen von CdaA und CdaS gut kompensiert werden kann, durch Deletion von *disA* die c-di-AMP Konzentration jedoch niedriger ist. Allerdings ergeben die Resultate der beiden Doppelmutanten an der Stelle wenig Sinn. Zumindest wurde erwartet, dass bei der Doppelmutante $\Delta cdaS \Delta disA$ das Level ähnlich wie in der *disA* Einzelmutante ist. Allerdings zeigt die Doppelmutante eine höhere c-di-AMP Konzentration. Auch die zweite Doppelmutante ist insofern in Frage zu stellen, als dass die Deletion von *cdaA* zusammen mit *cdaS* jetzt doch einen Einfluss hat, obwohl die Sporulation noch nicht eingetreten ist. Dieses unerwartete Bild setzte sich auch unter Salzstress fort. In den Einzelmutanten deutet sich dieses Mal an, dass sowohl das Fehlen von DisA als auch das Fehlen von CdaA die c-di-AMP Konzentration sinken lässt. Auch die Deletion von *cdaS* scheint sich an der Stelle geringfügig auszuwirken. Bei der Doppelmutante $\Delta cdaS \Delta disA$ bleibt die Konzentration ähnlich niedrig wie bei $\Delta disA$. Hingegen führt das Hinzufügen von $\Delta cdaS$ zu $\Delta cdaA$ zu einem unerwartet hohem c-di-AMP Level.

Blendet man an der Stelle die Doppelmutanten aus und betrachtet die Einzelmutanten, sorgt hauptsächlich DisA unter Standardbedingungen für eine Anpassung der c-di-AMP Konzentration, denn deren Fehlen kann offensichtlich nicht kompensiert werden. DisA synthetisiert in seiner Hauptfunktion nicht c-di-AMP, sondern scannt die DNA auf Schäden und ist in der Lage durch Veränderungen des c-di-AMP Levels unter Anderem die Sporulation zu verzögern (Bejerano-Sagie et al., 2006; Raguse et al., 2017; Valenzuela-Garcia et al., 2018). Von der Seite ist es vorstellbar, dass CdaA vermutlich diese Funktion nicht einfach übernehmen kann. Allerdings ist umgekehrt CdaA offensichtlich in die Regulation der Zellwandsynthese involviert, denn eine Deletion von *cdaA* führt zu höherer Sensitivität gegenüber Antibiotika, welche die Zellwand angreifen (Luo und Helmann, 2012). Vermutlich kommt CdaA aber nur bei Stress die Zellwand betreffend zum Einsatz, denn in Minimalmedium ohne Salzstress ist durch $\Delta cdaS$ das c-di-AMP Level kaum beeinflusst. Allerdings stellt 1,2 M NaCl offensichtlich eine Stresssituation für CdaA dar, denn unter der Bedingung kann das fehlende c-di-AMP nicht kompensiert werden. Betrachtet man dieses Ergebnis zusammen mit den Daten aus der Messung der Zellwanddicke bei verschiedenen Wachstumsbedingungen, ergibt sich folgende Vermutung: Unter Salzstress wird zum Schutz die Zellwand verdickt. Durch Involvierung von CdaA in die Zellwandsynthese wird an der Stelle c-di-AMP vermehrt produziert. Durch Deletion von *cdaA* ist

das nicht mehr möglich und DisA, welches an der DNA agiert, kann die Produktion nicht mehr kompensieren.

Alle diese Vermutungen werfen am Ende aber die Frage auf, inwiefern Deletionen von Diadenylatzyklasen sich auf das Wachstum an sich auswirken, wenn diese in wichtige Dinge wie DNA Reparatur und Zellwandsynthese involviert sind. Erstaunlicherweise zeigten alle Mutanten unabhängig von der Osmolarität des Mediums keinerlei Wachstumsphänotyp. Das wurde zum einen bei der Bestimmung der c-di-AMP Konzentration deutlich: Alle Stämme zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten und erreichten die Ziel-OD nahezu zur gleichen Zeit. Zum anderen ist die Bestimmung des Prolin-pools ein Indikator dafür, ob die Adaption an osmotischen Stress wie erwartet verlaufen ist. Dieser war für alle Mutanten im erwarteten Bereich um 500 mM. Schlussendlich zeigte die Aufnahme von Wachstumskurven mittels Mikrotiterplattenphotometer auch keine signifikanten Unterschiede, was sich in ähnlichen Wachstumsraten äußerte (siehe Abb. 34, Seite 83). Alle diese Beobachtungen schließen darauf, dass bei bestimmten Deletionen der Diadenylatzyklasen die Konzentration von c-di-AMP an der Zelle zwar sinkt, das aber keinerlei Einfluss hat, weder auf das Wachstum an sich, noch bei der Adaption an osmotisch bedingtem Stress. Aus diesem Grund wäre es für zukünftige Analysen von Bedeutung, die c-di-AMP Nullmutante bzw. die Doppelmutante $\Delta cdaA \Delta disA$ noch zu bekommen. Allerdings ist dafür ein Medium mit 0,1 mM Kalium nötig, wo *B. subtilis* bei 1,2 M NaCl noch wachsen kann. Dieses konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden.

6.6 Ausblick: c-di-AMP - der ultimative Osmoregulator?

Betrachtet man das aktuelle Bild von *B. subtilis* bei Osmostress, fällt auf, dass c-di-AMP in viele Regulationsmechanismen involviert ist (rot markiertes c-di-AMP, Abb. 39). In einigen aktuellen Publikationen wird c-di-AMP auch als „der Osmoregulator schlechthin“ betitelt. Das hat darin seine Ursache, dass für einige Organismen schon gezeigt wurde, dass c-di-AMP nicht nur in die Kaliumhomöostase, sondern auch in die Regulation von Opu Transportern involviert ist.

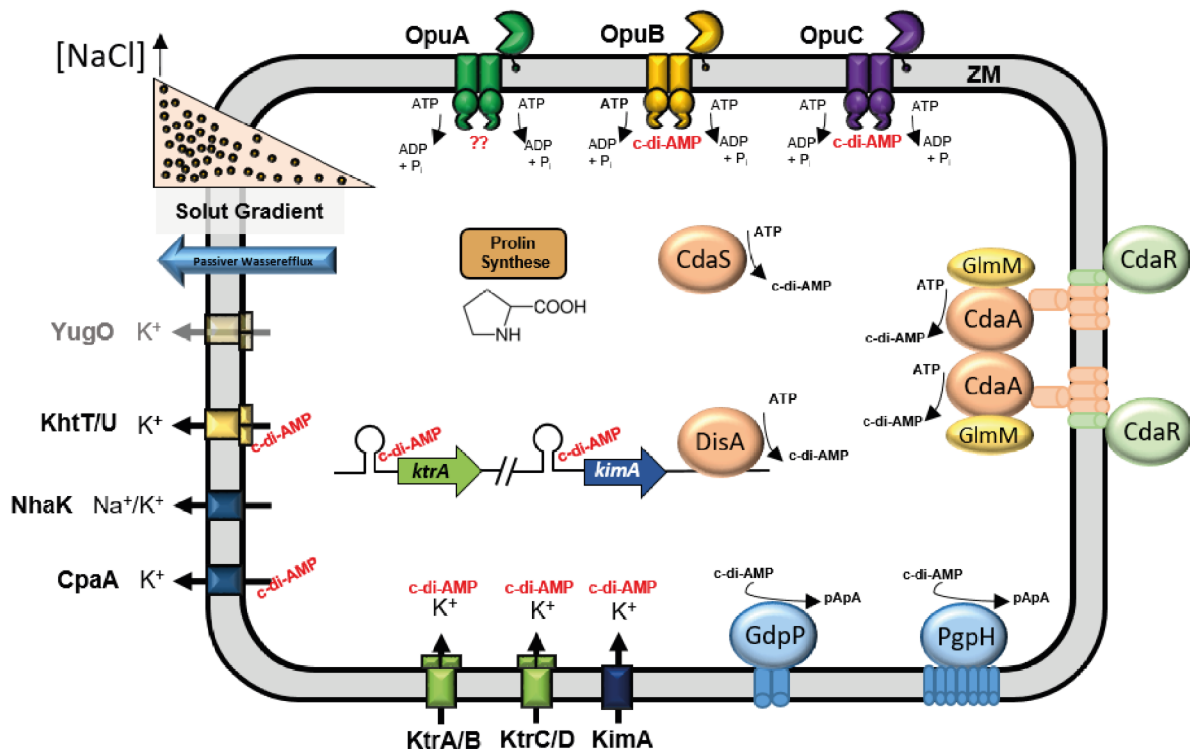


Abbildung 39: Die *B. subtilis* Zelle in der Welt von Osmoregulation und c-di-AMP. Dargestellt sind Zellkomponenten, welche in die Osmostressantwort involviert sind (OpuD und OpuE nicht gezeigt) sowie alle Diadenylatzyklasten (orange) und Phosphodiesterasen (hellblau). Ebenfalls nicht gezeigt sind die Natriumexporter Mrp und NhaC. C-di-AMP (rot markiert) zeigt bisher bestätigte Bindungspartner.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern die Aufnahme von kompatiblen Soluten in *B. subtilis* auch von c-di-AMP reguliert wird. Zumindest konnte *in vitro* gezeigt werden, dass c-di-AMP auch an zwei der drei Opu ABC Transporter bindet. Zusätzlich wurden einige interessante Mutanten gefunden, welche zeigen, dass einige Aminosäuren in der CBS Domäne essenziell sind für die Koordination von c-di-AMP in der Bindetasche. Wie bereits weiter oben erwähnt, bleibt allerdings die Frage offen, warum der Haupttransporter für Glycinbetain, OpuA, trotz Vorhandensein einer CBS Domäne nicht von c-di-AMP reguliert wird. Eine Bindung des sehr ähnlichen c-di-GMPs konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Um das weiter zu analysieren wäre das Ergebnis interessant, wenn man die CBS Domäne von OpuA deletiert und das Konstrukt im Wachstum testet.

Bei den *in vivo* Tests traten einige Probleme auf, sodass die Theorie, dass c-di-AMP die Opu Transporter abschaltet, weder bestätigt noch widerlegt werden konnte. Allerdings brachten alle diese Experimente wichtige Erkenntnisse: (I) Im Standardminimalmedium für *B. subtilis*,

welches bisher für viele Osmo-relevante Fragen verwendet wurde, sind die CBS Domänen von OpuB und OpuC verzichtbar und damit auch die Bindung von c-di-AMP. (II) Unter osmotischen Stressbedingungen ist neben dem schnellen Im- und Export von Kalium die osmoadaptive Prolinsynthese von besonderer Bedeutung. Selbst bei Kaliummangel kann dieser Vorgang wie erwartet stattfinden. Des Weiteren stört es für die Zelle bei Osmostress offensichtlich auch nicht, wenn die c-di-AMP Konzentration erniedrigt ist, die Adaption funktioniert trotzdem wie im Wildtyp.

Ausgehend von den Ergebnissen kann damit gesagt werden, dass c-di-AMP wohl involviert ist in die Osmoadaption, auch in die Regulation von Opu Transportern, der gesamte Mechanismus jedoch komplex ist und die bereits erforschten physiologischen Anpassungen, besonders die osmoadaptive Prolinsynthese (Brill et al., 2011a; Hoffmann et al., 2013), die Hauptrolle spielen.

7 Literaturverzeichnis

- Alvarez, F. J. D., Orelle, C., Huang, Y., Bajaj, R., Everly, R. M., Klug, C. S. & Davidson, A. L.** (2015). Full engagement of liganded maltose-binding protein stabilizes a semi-open ATP-binding cassette dimer in the maltose transporter. *Mol Microbiol*, 98(5), 878–894.
- Amikam, D. & Benziman, M.** (1989). Cyclic diguanylic acid and cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 171(12), 6649–6655.
- Anantharaman, V. & Aravind, L.** (2003). Application of comparative genomics in the identification and analysis of novel families of membrane-associated receptors in bacteria. *BMC Genomics*, 4(1).
- Bai, Y., Yang, J., Eisele, L. E., Underwood, A. J., Koestler, B. J., Waters, C. M., Metzger, D. W. & Bai, G.** (2013). Two DHH subfamily 1 proteins in *Streptococcus pneumoniae* possess cyclic di-AMP phosphodiesterase activity and affect bacterial growth and virulence. *J Bacteriol*, 195(22), 5123–5132.
- Ballal, A., Basu, B. & Apte, S. K.** (2007). The Kdp-ATPase system and its regulation. *J Biosci*, 32(3), 559–568.
- Bashir, A., Hoffmann, T., Smits, S. H. J. & Bremer, E.** (2014a). Dimethylglycine provides salt and temperature stress protection to *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 80(9), 2773–2785.
- Bashir, A., Hoffmann, T., Kempf, B., Xie, X., Smits, S. H. J. & Bremer, E.** (2014b). Plant-derived compatible solutes proline betaine and betonidine confer enhanced osmotic and temperature stress tolerance to *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 160(10), 2283–2294.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, I. D.** (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39(1), 205–207.
- Bedrunka, P. & Graumann, P. L.** (2017a). New functions and subcellular localization patterns of c-di-GMP components (GGDEF domain proteins) in *B. subtilis*. *Front Microbiol*, 8.
- Bedrunka, P. & Graumann, P. L.** (2017b). Subcellular clustering of a putative c-di-GMP-dependent exopolysaccharide machinery affecting macro colony architecture in *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol Rep*, 9(3), 211–222.
- Bejerano-Sagie, M., Oppenheimer-Shaanan, Y., Berlatzky, I., Rouvinski, A., Meyerovich, M. & Ben-Yehuda, S.** (2006). A checkpoint protein that scans the chromosome for damage at the start of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 125(4), 679–690.
- Belitsky, B. R., Brill, J., Bremer, E. & Sonenshein, A. L.** (2001). Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 183(14), 4389–4392.

-
- Bennett, B. D., Kimball, E. H., Gao, M., Osterhout, R., Dien, S. J. V. & Rabinowitz, J. D.** (2009). Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol*, 5(8), 593–599.
- Berntsson, R. P.-A., Smits, S. H., Schmitt, L., Slotboom, D.-J. & Poolman, B.** (2010). A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett*, 584(12), 2606–2617.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T. G., Bertoni, M., Bordoli, L. & Schwede, T.** (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*, 42(W1), 252–258.
- Biemans-Oldehinkel, E., Mahmood, N. A. B. N. & Poolman, B.** (2006a). A sensor for intracellular ionic strength. *Proc Natl Acad Sci*, 103(28), 10624–10629.
- Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M. K. & Poolman, B.** (2006b). ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett*, 580(4), 1023–1035.
- Blohn, C. V., Kempf, B., Kappes, R. M. & Bremer, E.** (1997). Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system OpuE regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol Microbiol*, 25(1), 175–187.
- Boch, J., Kempf, B. & Bremer, E.** (1994). Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J Bacteriol*, 176(17), 5364–5371.
- Boch, J., Kempf, B., Schmid, R. & Bremer, E.** (1996). Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J Bacteriol*, 178(17), 5121–5129.
- Booth, I. R., Edwards, M. D., Black, S., Schumann, U. & Miller, S.** (2007). Mechanosensitive channels in bacteria: signs of closure? *Nat Rev Microbiol*, 5(6), 431–440.
- Booth, I. R. & Blount, P.** (2012). The MscS and MscL families of mechanosensitive channels act as microbial emergency release valves. *J Bacteriol*, 194(18), 4802–4809.
- Bowman, L., Zeden, M. S., Schuster, C. F., Kaeffer, V. & Gründling, A.** (2016). New insights into the cyclic di-adenosine monophosphate (c-di-AMP) degradation pathway and the requirement of the cyclic dinucleotide for acid stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 291(53), 26970–26986.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72(1-2), 248–254.
- Bremer, E.** (2000). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in *B. subtilis*. In Bacterial stress response. Storz, G., und Hengge-Aronis, R. (Editoren). *ASM Press, Washington D. C.*, 126, 79–97.

-
- Bremer, E. & Krämer, R.** (2019). Responses of microorganisms to osmotic stress. *Annu Rev Microbiol*, 73(1), 313–334.
- Brill, J., Hoffmann, T., Bleisteiner, M. & Bremer, E.** (2011a). Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *J Bacteriol*, 193(19), 5335–5346.
- Brill, J., Hoffmann, T., Putzer, H. & Bremer, E.** (2011b). T-box-mediated control of the anabolic proline biosynthetic genes of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 157(4), 977–987.
- Brown, A. D. & Simpson, J. R.** (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol*, 72(3), 589–591.
- Broy, S., Chen, C., Hoffmann, T., Brock, N. L., Nau-Wagner, G., Jebbar, M., Smits, S. H. J., Dickschat, J. S. & Bremer, E.** (2015). Abiotic stress protection by ecologically abundant dimethylsulfoniopropionate and its natural and synthetic derivatives: insights from *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol*, 17(7), 2362–2378.
- Busby, S. & Ebright, R. H.** (1997). Transcription activation at Class II CAP-dependent promoters. *Mol Microbiol*, 23(5), 853–859.
- Chaudhuri, R. R., Allen, A. G., Owen, P. J., Shalom, G., Stone, K., Harrison, M., Burgis, T. A., Lockyer, M., Garcia-Lara, J., Foster, S. J., Pleasance, S. J., Peters, S. E., Maskell, D. J. & Charles, I. G.** (2009). Comprehensive identification of essential *Staphylococcus aureus* genes using transposon-mediated differential hybridisation (TMDH). *BMC Genomics*, 10(1), 291.
- Chen, C. & Beattie, G. A.** (2007). Characterization of the osmoprotectant transporter OpuC from *Pseudomonas syringae* and demonstration that cystathionine- β -synthase domains are required for its osmoregulatory function. *J Bacteriol*, 189(19), 6901–6912.
- Chen, J.** (2013). Molecular mechanism of the *Escherichia coli* maltose transporter. *Curr Opin Struct Biol*, 23(4), 492–498.
- Chen, Y., Chai, Y., Guo, J.-h. & Losick, R.** (2012). Evidence for cyclic di-GMP-mediated signaling in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 194(18), 5080–5090.
- Chin, K.-H., Liang, J.-M., Yang, J.-G., Shih, M.-S., Tu, Z.-L., Wang, Y.-C., Sun, X.-H., Hu, N.-J., Liang, Z.-X., Dow, J. M., Ryan, R. P. & Chou, S.-H.** (2015). Structural insights into the distinct binding mode of cyclic di-AMP with *Sa* CpaA-RCK. *Biochemistry*, 54(31), 4936–4951.
- Cho, K. H. & Kang, S. O.** (2013). *Streptococcus pyogenes* c-di-AMP phosphodiesterase, GdpP, influences SpeB processing and virulence. *PLoS ONE*, 8(7), e69425.
- Civril, F., Deimling, T., de Oliveira Mann, C. C., Ablasser, A., Moldt, M., Witte, G., Hornung, V. & Hopfner, K.-P.** (2013). Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature*, 498(7454), 332–337.

-
- Commichau, F. M., Heidemann, J. L., Ficner, R. & Stülke, J.** (2018). Making and breaking of an essential poison: the cyclases and phosphodiesterases that produce and degrade the essential second messenger cyclic di-AMP in bacteria. *J Bacteriol*, 201(1), e00462–18.
- Corrigan, R. & Gründling, A.** (2013). Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nat Rev Microbiol*, 11(8), 513–524.
- Csonka, L. N.** (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev*, 53(1), 121–147.
- Csonka, L. N., Ikeda, T. P., Fletcher, S. A. & Kustu, S.** (1994). The accumulation of glutamate is necessary for optimal growth of *Salmonella typhimurium* in media of high osmolality but not induction of the *proU* operon. *J Bacteriol*, 176(20), 6324–6333.
- Cutting, S. M. & Vander-Horn, P.** (1990). Genetic analysis. *Molecular Biological Methods for Bacillus*, John Wiley and Sons Ltd. S. 27–74.
- Davidson, A. L. & Chen, J.** (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem*, 73(1), 241–268.
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C. & Chen, J.** (2008). Structure, function and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(2), 317–364.
- Davies, B., Bogard, R. & Mekalanos, J.** (2012). Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. *Cell*, 149(2), 358–370.
- Devaux, L., Sleiman, D., Mazzuoli, M.-V., Gominet, M., Lanotte, P., Trieu-Cuot, P., Kaminski, P.-A. & Firon, A.** (2018). Cyclic di-AMP regulation of osmotic homeostasis is essential in Group B *Streptococcus*. *PLOS Genet*, 14(4), e1007342.
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D. & Goloubinoff, P.** (2001). Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. *J Biol Chem*, 276(43), 39586–39591.
- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. & Bakker, E. P.** (1988). Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol*, 150(4), 348–357.
- Dow, J. M., Fouhy, Y., Lucey, J. F. & Ryan, R. P.** (2006). The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling and bacterial virulence to plants. *Mol Plant Microbe In*, 19(12), 1378–1384.
- Du, Y., Shi, W.-W., He, Y.-X., Yang, Y.-H., Zhou, C.-Z. & Chen, Y.** (2011). Structures of the substrate-binding protein provide insights into the multiple compatible solute binding specificities of the *Bacillus subtilis* ABC transporter OpuC. *Biochem J*, 436(2), 283–289.
- Dubnau, D.** (1991). The regulation of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 5(1), 11–18.

-
- Duhr, S. & Braun, D.** (2006). Why molecules move along a temperature gradient. *Proc Natl Acad Sci*, 103(52), 19678–19682.
- Ebright, R. H.** (1993). Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters. *Mol Microbiol*, 8(5), 797–802.
- Eitinger, T., Rodionov, D. A., Grote, M. & Schneider, E.** (2011). Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS Microbiol Rev*, 35(1), 3–67.
- Epstein, W.** (2003). The roles and regulation of potassium in bacteria. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (S. 293–320).
- Fujisawa, M., Ito, M. & Krulwich, T. A.** (2007). Three two-component transporters with channel-like properties have monovalent cation/proton antiport activity. *Proc Natl Acad Sci*, 104(33), 13289–13294.
- Gao, A. & Serganov, A.** (2014). Structural insights into recognition of c-di-AMP by the *ydaO* riboswitch. *Nat Chem Biol*, 10(9), 787–792.
- Gao, X., Mukherjee, S., Matthews, P. M., Hammad, L. A., Kearns, D. B. & Dann, C. E.** (2013). Functional characterization of core components of the *Bacillus subtilis* cyclic-di-GMP signaling pathway. *J Bacteriol*, 195(21), 4782–4792.
- Gardan, R., Rapoport, G. & Débarbouillé, M.** (1995). Expression of the *rocDEF* operon involved in arginine catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*, 249(5), 843–856.
- Gibhardt, J., Hoffmann, G., Turdiev, A., Wang, M., Lee, V. T. & Commichau, F. M.** (2019). c-di-AMP assists osmoadaptation by regulating the *Listeria monocytogenes* potassium transporters KimA and KtrCD. *J Biol Chem*, 294(44), 16020–16033.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A. & Smith, H. O.** (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 6(5), 343–345.
- Giraldez, T. & Rothberg, B. S.** (2017). Understanding the conformational motions of RCK gating rings. *J Gen Physiol*, 149(4), 431–441.
- Górecki, K., Hägerhäll, C. & Drakenberg, T.** (2014). The Na⁺ transport in gram-positive bacteria defect in the Mrp antiporter complex measured with ²³Na nuclear magnetic resonance. *Anal Biochem*, 445, 80–86.
- Grote, M., Polyhach, Y., Jeschke, G., Steinhoff, H.-J., Schneider, E. & Bordignon, E.** (2009). Transmembrane signaling in the maltose ABC Transporter MalFGK₂-E. *J Biol Chem*, 284(26), 17521–17526.
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A. & Oren, A.** (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol Rev*, 42(3), 353–375.

-
- Gundlach, J., Mehne, F. M. P., Herzberg, C., Kampf, J., Valerius, O., Kaefer, V. & Stülke, J.** (2015). An essential poison: synthesis and degradation of cyclic di-AMP in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 197(20), 3265–3274.
- Gundlach, J., Herzberg, C., Hertel, D., Thürmer, A., Daniel, R., Link, H. & Stülke, J.** (2017a). Adaptation of *Bacillus subtilis* to life at extreme potassium limitation. *mBio*, 8(4), e00861–17.
- Gundlach, J., Herzberg, C., Kaefer, V., Gunka, K., Hoffmann, T., Weiß, M., Gibhardt, J., Thürmer, A., Hertel, D., Daniel, R., Bremer, E., Commichau, F. M. & Stülke, J.** (2017b). Control of potassium homeostasis is an essential function of the second messenger cyclic di-AMP in *Bacillus subtilis*. *Sci Signal*, 10(475), eaal3011.
- Gundlach, J., Krüger, L., Herzberg, C., Turdiev, A., Poehlein, A., Tascón, I., Weiss, M., Hertel, D., Daniel, R., Hänelt, I., Lee, V. T. & Stülke, J.** (2019). Sustained sensing in potassium homeostasis: cyclic di-AMP controls potassium uptake by KimA at the levels of expression and activity. *J Biol Chem*, 294(24), 9605–9614.
- Hahne, H., Mäder, U., Otto, A., Bonn, F., Steil, L., Bremer, E., Hecker, M. & Becher, D.** (2010). A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation. *J Bacteriol*, 192(3), 870–882.
- Hattori, M., Tanaka, Y., Fukai, S., Ishitani, R. & Nureki, O.** (2007). Crystal structure of the MgtE Mg²⁺ transporter. *Nature*, 448(7157), 1072–1075.
- Heidemann, J. L., Neumann, P., Dickmanns, A. & Ficner, R.** (2019). Crystal structures of the c-di-AMP–synthesizing enzyme CdaA. *J Biol Chem*, 294(27), 10463–10470.
- Hengge, R.** (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 7(4), 263–273.
- Higgins, C. F.** (1992). ABC Transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 8(1), 67–113.
- Hoffmann, T., Boiangiu, C., Moses, S. & Bremer, E.** (2008). Responses of *Bacillus subtilis* to hypotonic challenges: physiological contributions of mechanosensitive channels to cellular survival. *Appl Environ Microbiol*, 74(8), 2454–2460.
- Hoffmann, T. & Bremer, E.** (2011). Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible -solute acquisition. *J Bacteriol*, 193(7), 1552–1562.
- Hoffmann, T., Wensing, A., Brosius, M., Steil, L., Volker, U. & Bremer, E.** (2013). Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. *J Bacteriol*, 195(3), 510–522.
- Hoffmann, T. & Bremer, E.** (2017a). Guardians in a stressful world: the Opu family of compatible solute transporters from *Bacillus subtilis*. *Biol Chem*, 398(2), 193–214.
- Hoffmann, T., Bleisteiner, M., Sappa, P. K., Steil, L., Mäder, U., Völker, U. & Bremer, E.** (2017b). Synthesis of the compatible solute proline by *Bacillus subtilis*: point mutations ren-

dering the osmotically controlled *proHJ* promoter hyperactive. *Environ Microbiol*, 19(9), 3700–3720.

Hollenstein, K., Dawson, R. J. & Locher, K. P. (2007). Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 17(4), 412–418.

Holtmann, G., Bakker, E. P., Uozumi, N. & Bremer, E. (2003). KtrAB and KtrCD: Two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J Bacteriol*, 185(4), 1289–1298.

Holtmann, G. & Bremer, E. (2004). Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J Bacteriol*, 186(6), 1683–1693.

Horn, C., Bremer, E. & Schmitt, L. (2003). Nucleotide dependent monomer/dimer equilibrium of OpuAA, the nucleotide-binding protein of the osmotically regulated ABC Transporter OpuA from *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 334(3), 403–419.

Horn, C., Sohn-Böscher, L., Breed, J., Welte, W., Schmitt, L. & Bremer, E. (2006). Molecular determinants for substrate specificity of the ligand-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis* for the compatible solutes glycine betaine and proline betaine. *J Mol Biol*, 357(2), 592–606.

Horn, C., Jenewein, S., Tschapek, B., Bouschen, W., Metzger, S., Bremer, E. & Schmitt, L. (2008). Monitoring conformational changes during the catalytic cycle of OpuAA, the ATPase subunit of the ABC transporter OpuA from *Bacillus subtilis*. *Biochem J*, 412(2), 233–244.

Hourdel, V., Volant, S., O'Brien, D. P., Chenal, A., Chamot-Rooke, J., Dillies, M.-A. & Brier, S. (2016). MEMHDX: an interactive tool to expedite the statistical validation and visualization of large HDX-MS datasets. *Bioinformatics*, 32(22), 3413–3419.

Huynh, T. N., Luo, S., Pensinger, D., Sauer, J.-D., Tong, L. & Woodward, J. J. (2015). An HD-domain phosphodiesterase mediates cooperative hydrolysis of c-di-AMP to affect bacterial growth and virulence. *Proc Natl Acad Sci*, 112(7), 747–756.

Huynh, T. N. & Woodward, J. J. (2016a). Too much of a good thing: regulated depletion of c-di-AMP in the bacterial cytoplasm. *Curr Opin Microbiol*, 30, 22–29.

Huynh, T. N., Choi, P. H., Sureka, K., Ledvina, H. E., Campillo, J., Tong, L. & Woodward, J. J. (2016b). Cyclic di-AMP targets the cystathionine beta-synthase domain of the osmolyte transporter OpuC. *Mol Microbiol*, 102(2), 233–243.

Hvorup, R. N., Goetz, B. A., Niederer, M., Hollenstein, K., Perozo, E. & Locher, K. P. (2007). Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. *Science*, 317(5843), 1387–1390.

Jenal, U. & Malone, J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Ann Rev Genet*, 40(1), 385–407.

-
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P. & Duhr, S.** (2011). Molecular interaction studies using Microscale Thermophoresis. *ASSAY Drug Dev Techn*, 9(4), 342–353.
- Joseph, B., Jeschke, G., Goetz, B. A., Locher, K. P. & Bordignon, E.** (2011). Transmembrane gate movements in the type II ATP-binding cassette (ABC) importer BtuCD-F during nucleotide cycle. *J Biol Chem*, 286(47), 41008–41017.
- Kappes, R. M., Kempf, B. & Bremer, E.** (1996). Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J Bacteriol*, 178(17), 5071–5079.
- Kappes, R. M., Kempf, B., Kneip, S., Boch, J., Gade, J., Meier-Wagner, J. & Bremer, E.** (1999). Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 32(1), 203–216.
- Kapust, R. B. & Waugh, D. S.** (1999). *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci*, 8(8), 1668–1674.
- Karasawa, A., Erkens, G. B., Berntsson, R. P.-A., Otten, R., Schuurman-Wolters, G. K., Mulder, F. A. A. & Poolman, B.** (2011). Cystathionine-beta-synthase (CBS) domains 1 and 2 fulfill different roles in ionic strength sensing of the ATP-binding Cassette (ABC) Transporter OpuA. *J Biol Chem*, 286(43), 37280–37291.
- Karasawa, A., Swier, L. J. Y. M., Stuart, M. C. A., Brouwers, J., Helms, B. & Poolman, B.** (2013). Physicochemical factors controlling the activity and energy coupling of an ionic strength-gated ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J Biol Chem*, 288(41), 29862–29871.
- Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K. D.** (2017). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform*, 20(4), 1160–1166.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. E.** (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, 10(6), 845–858.
- Kempf, B. & Bremer, E.** (1995). OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 270(28), 16701–16713.
- Kempf, B. & Bremer, E.** (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol*, 170(5), 319–330.
- Kim, L., Mogk, A. & Schumann, W.** (1996). A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene*, 181(1-2), 71–76.
- Knapp, S., Ladenstein, R. & Galinski, E. A.** (1999). Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes β -hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles*, 3(3), 191–198.

Kodis, E. J., Smindak, R. J., Kefauver, J. M., Heffner, D. L., Aschenbach, K. L., Brennan, E. R., Chan, K., Gamage, K. K., Lambeth, P. S., Lawler, J. R., Sikora, A. K., Vercruysse, N. R. & Deppmann, C. D. (2012). First messengers. *eLS*.

Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. & Adhya, S. (1993). Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem*, 62(1), 749–797.

Koo, B.-M., Kritikos, G., Farelli, J. D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H., Wapinski, I., Galar-dini, M., Cabal, A., Peters, J. M., Hachmann, A.-B., Rudner, D. Z., Allen, K. N., Typas, A. & Gross, C. A. (2017). Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Syst*, 4(3), 291–305.

Korkhov, V. M., Mireku, S. A., Veprintsev, D. B. & Locher, K. P. (2014). Structure of AMP-PNP-bound BtuCD and mechanism of ATP-powered vitamin B12 transport by BtuCD–F. *Nat Struct Mol Biol*, 21(12), 1097–1099.

Kunz, S., Tribensky, A., Steinchen, W., Oviedo-Bocanegra, L., Bedrunka, P. & Graumann, P. L. (2020). Cyclic di-GMP signaling in *Bacillus subtilis* is governed by direct interactions of diguanylate cyclases and cognate receptors. *mBio*, 11(2), e03122–19.

Lee, C.-H., Wu, T.-Y. & Shaw, G.-C. (2013). Involvement of OpcR, a GbsR-type transcriptional regulator, in negative regulation of two evolutionarily closely related choline uptake genes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 159(Pt_10), 2087–2096.

Liu, S., Bayles, D. O., Mason, T. M. & Wilkinson, B. J. (2006). A cold-sensitive *Listeria monocytogenes* mutant has a transposon insertion in a gene encoding a putative membrane protein and shows altered (p)ppGpp levels. *Appl Environ Microbiol*, 72(6), 3955–3959.

Locher, K. P. (2016). Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol*, 23(6), 487–493.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). Second messengers. *Molecular cell biology*, Scientific American Books New York, 3.

Luo, Y. & Helmann, J. D. (2012). Analysis of the role of *Bacillus subtilis* Σ^M in β -lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis. *Mol Microbiol*, 83(3), 623–639.

Makman, R. S. & Sutherland, E. W. (1965). Adenosine 3',5'-phosphate in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 240, 1309–1314.

Mandic-Mulec, I., Stefanic, P. & van Elsas, J. D. (2015). Ecology of *Bacillaceae*. *Microbiol Spectr*, 3(2), TBS-0017–2013.

Marmur, J. & Doty, P. (1961). Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J Mol Biol*, 3(5), 585–594.

-
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., Cowley, A. P. & Lopez, R.** (2013). Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res*, 41(W1), 597–600.
- Mehne, F. M. P., Gunka, K., Eilers, H., Herzberg, C., Kaefer, V. & Stülke, J.** (2013). Cyclic di-AMP homeostasis in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 288(3), 2004–2017.
- Mehne, F. M. P., Schröder-Tittmann, K., Eijlander, R. T., Herzberg, C., Hewitt, L., Kaefer, V., Lewis, R. J., Kuipers, O. P., Tittmann, K. & Stülke, J.** (2014). Control of the diadenylate cyclase CdaS in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 289(30), 21098–21107.
- Merritt, J. H., Ha, D.-G., Cowles, K. N., Lu, W., Morales, D. K., Rabinowitz, J., Gitai, Z. & O'Toole, G. A.** (2010). Specific control of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated behaviors by two c-di-GMP diguanylate cyclases. *mBio*, 1(4), e00183–10.
- Miles, E. W. & Kraus, J. P.** (2004). Cystathionine-beta-synthase: structure, function, regulation and location of homocystinuria-causing mutations. *J Biol Chem*, 279(29), 29871–29874.
- Miller, J. H.** (1972). Experiments in molecular genetics.
- Moscoso, J. A., Schramke, H., Zhang, Y., Tosi, T., Dehbi, A., Jung, K. & Gründling, A.** (2015). Binding of cyclic di-AMP to the *Staphylococcus aureus* sensor kinase KdpD occurs via the universal stress protein domain and downregulates the expression of the Kdp potassium transporter. *J Bacteriol*, 198(1), 98–110.
- Moses, S.** (1999). Molekulare und physiologische Charakterisierung der Prolinverwertung in *Bacillus subtilis* und Untersuchungen zum Efflux und Recycling von osmotischen Schutzsubstanzen. Philipps-Universität Marburg, Dissertation.
- Müller, M., Deimling, T., Hopfner, K.-P. & Witte, G.** (2015). Structural analysis of the diadenylate cyclase reaction of DNA-integrity scanning protein A (DisA) and its inhibition by 3'-dATP. *Biochem J*, 469(3), 367–374.
- Nau-Wagner, G., Oppen, D., Rolbetzki, A., Boch, J., Kempf, B., Hoffmann, T. & Bremer, E.** (2012). Genetic control of osmoadaptive glycine betaine synthesis in *Bacillus subtilis* through the choline-sensing and glycine betaine-responsive GbsR repressor. *J Bacteriol*, 194(10), 2703–2714.
- Nelson, J. W., Sudarsan, N., Furukawa, K., Weinberg, Z., Wang, J. X. & Breaker, R. R.** (2013). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP. *Nat Chem Biol*, 9(12), 834–839.
- Obis, D., Guillot, A., Gripon, J.-C., Renault, P., Bolotin, A. & Mistou, M.-Y.** (1999). Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC Transporters. *J Bacteriol*, 181(20), 6238–6246.

-
- Ogura, M., Tsukahara, K., Hayashi, K. & Tanaka, T.** (2007). The *Bacillus subtilis* NatK–NatR two-component system regulates expression of the *natAB* operon encoding an ABC transporter for sodium ion extrusion. *Microbiology*, 153(3), 667–675.
- Okabayashi, T., Ide, M. & Yoshimoto, A.** (1963). Excretion of adenosine-3',5'-phosphate in the culture broth of *Brevibacterium liquefaciens*. *Arch Biochem Biophys*, 100(1), 158–159.
- Oldham, M. L., Khare, D., Quijcho, F. A., Davidson, A. L. & Chen, J.** (2007). Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature*, 450(7169), 515–521.
- Oppenheimer-Shaanan, Y., Wexselblatt, E., Katzhendler, J., Yavin, E. & Ben-Yehuda, S.** (2011). c-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*. *EMBO rep*, 12(6), 594–601.
- Orelle, C., Alvarez, F. J. D., Oldham, M. L., Orelle, A., Wiley, T. E., Chen, J. & Davidson, A. L.** (2010). Dynamics of alpha-helical subdomain rotation in the intact maltose ATP-binding cassette transporter. *Proc Natl Acad Sci*, 107(47), 20293–20298.
- Oren, A.** (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(2), 334–348.
- Oren, A.** (2011). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environ Microbiol*, 13(8), 1908–1923.
- Oren, A.** (2013). Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations and acidic proteomes. *Front Microbiol*, 4.
- Osorio-Valeriano, M., Altegoer, F., Steinchen, W., Urban, S., Liu, Y., Bange, G. & Thanbichler, M.** (2019). ParB-type DNA segregation proteins are CTP-dependent molecular switches. *Cell*, 179(7), 1512–1524.
- Oswald, C., Holland, I. B. & Schmitt, L.** (2006). The motor domains of ABC-transporters. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 372(6), 385–399.
- Patzlaff, J. S., van der Heide, T. & Poolman, B.** (2003). The ATP/substrate stoichiometry of the ATP-binding Cassette (ABC) Transporter OpuA. *J Biol Chem*, 278(32), 29546–29551.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E.** (2004). UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13), 1605–1612.
- Pham, H. T., Nhiep, N. T. H., Vu, T. N. M., Huynh, T. N., Zhu, Y., Huynh, A. L. D., Chakraborti, A., Marcellin, E., Lo, R., Howard, C. B., Bansal, N., Woodward, J. J., Liang, Z.-X. & Turner, M. S.** (2018). Enhanced uptake of potassium or glycine betaine or export of cyclic-di-AMP restores osmoresistance in a high cyclic-di-AMP *Lactococcus lactis* mutant. *PLoS Genet*, 14(8), e1007574.
- Pittelkow, M., Tschapek, B., Smits, S. H., Schmitt, L. & Bremer, E.** (2011). The crystal structure of the substrate-binding protein OpuBC from *Bacillus subtilis* in complex with choline. *J Mol Biol*, 411(1), 53–67.
-

-
- Prindle, A., Liu, J., Asally, M., Ly, S., Garcia-Ojalvo, J. & Süel, G. M.** (2015). Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. *Nature*, 527(7576), 59–63.
- Ragumani, S., Sauder, J. M., Burley, S. K. & Swaminathan, S.** (2010). Structural studies on cytosolic domain of magnesium transporter MgtE from *Enterococcus faecalis*. *Proteins: Struct Funct Bioinf*, 78(2), 487–491.
- Raguse, M., Torres, R., Seco, E. M., Gándara, C., Ayora, S., Moeller, R. & Alonso, J. C.** (2017). *Bacillus subtilis* DisA helps to circumvent replicative stress during spore revival. *DNA Repair*, 59, 57–68.
- Rall, T. W. & Sutherland, E. W.** (1958). Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem*, 232(2), 1065–1076.
- Rallu, F., Gruss, A., Ehrlich, S. D. & Maguin, E.** (2002). Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. *Mol Microbiol*, 35(3), 517–528.
- Rao, F., See, R. Y., Zhang, D., Toh, D. C., Ji, Q. & Liang, Z.-X.** (2010). YybT is a signaling protein that contains a cyclic dinucleotide phosphodiesterase domain and a GGDEF domain with ATPase activity. *J Biol Chem*, 285(1), 473–482.
- Rao, F., Ji, Q., Soehano, I. & Liang, Z.-X.** (2011). Unusual heme-binding PAS domain from YybT family proteins. *J Bacteriol*, 193(7), 1543–1551.
- Richter, A. M., Possling, A., Malysheva, N., Yousef, K. P., Herbst, S., von Kleist, M. & Hengge, R.** (2020). Local c-di-GMP signaling in the control of synthesis of the *E. coli* biofilm exopolysaccharide pEtN-cellulose. *J Mol Biol*, 432(16), 4576–4595.
- Rismondo, J., Gibhardt, J., Rosenberg, J., Kaefer, V., Halbedel, S. & Commichau, F. M.** (2015). Phenotypes associated with the essential diadenylate cyclase CdaA and its potential regulator CdaR in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*, 198(3), 416–426.
- Rocha, R., Teixeira-Duarte, C. M., Jorge, J. M. & Morais-Cabral, J. H.** (2019). Characterization of the molecular properties of KtrC, a second RCK domain that regulates a Ktr channel in *Bacillus subtilis*. *J Struct Biol*, 205(3), 34–43.
- Romeo, Y., Obis, D., Bouvier, J., Guillot, A., Fourçans, A., Bouvier, I., Gutierrez, C. & Mistou, M.-Y.** (2003). Osmoregulation in *Lactococcus lactis*: BusR, a transcriptional repressor of the glycine betaine uptake system BusA. *Mol Microbiol*, 47(4), 1135–1147.
- Romling, U.** (2008). Great times for small molecules: c-di-AMP, a second messenger candidate in bacteria and archaea. *Sci Signal*, 1(33), pe39.
- Rosenberg, J., Dickmanns, A., Neumann, P., Gunka, K., Arens, J., Kaefer, V., Stülke, J., Ficner, R. & Commichau, F. M.** (2015). Structural and biochemical analysis of the essential diadenylate cyclase CdaA from *Listeria monocytogenes*. *J Biol Chem*, 290(10), 6596–6606.

-
- Ross, P. N., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G. A., van Boom, J. H. & Benziman, M.** (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 325(6101), 279–281.
- Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F., Jiang, B.-L., He, Y.-Q., Feng, J.-X., Tang, J.-L. & Dow, J. M.** (2006). Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol*, 63(2), 429–442.
- Sambrook, J. & Russell, D. W.** (2001). Molecular Cloning - a laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.
- Sarenko, O., Klauck, G., Wilke, F. M., Pfiffer, V., Richter, A. M., Herbst, S., Kaever, V. & Hengge, R.** (2017). More than enzymes that make or break cyclic di-GMP: local signaling in the interactome of GGDEF/EAL domain proteins of *Escherichia coli*. *mBio*, 8(5), e01639–17.
- Scheepers, G. H., a Nijeholt, J. A. L. & Poolman, B.** (2016). An updated structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett*, 590(23), 4393–4401.
- Schiefner, A., Breed, J., Bösser, L., Kneip, S., Gade, J., Holtmann, G., Diederichs, K., Welte, W. & Bremer, E.** (2003). Cation- π interactions as determinants for binding of the compatible solutes glycine betaine and proline betaine by the periplasmic ligand-binding protein ProX from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 279(7), 5588–5596.
- Schrecker, M., Wunnicke, D. & Hänelt, I.** (2019). How RCK domains regulate gating of K⁺ channels. *Biol Chem*, 400(10), 1303–1322.
- Schuster, C. F., Bellows, L. E., Tosi, T., Campeotto, I., Corrigan, R. M., Freemont, P. & Gründling, A.** (2016). The second messenger c-di-AMP inhibits the osmolyte uptake system OpuC in *Staphylococcus aureus*. *Sci Signal*, 9(441), ra81.
- Shilton, B. H.** (2008). The dynamics of the MBP-MalFGK₂ interaction: A prototype for binding protein dependent ABC-transporter systems. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes*, 1778(9), 1772–1780.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. & Römling, U.** (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol*, 53(4), 1123–1134.
- Smith, J. L., Goldberg, J. M. & Grossman, A. D.** (2014). Complete genome sequences of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* laboratory strains JH642 (AG174) and AG1839. *Genome Announc*, 2(4), e00663–14.
- Smith, W. M., Pham, T. H., Lei, L., Dou, J., Soomro, A. H., Beatson, S. A., Dykes, G. A. & Turner, M. S.** (2012). Heat resistance and salt hypersensitivity in *Lactococcus lactis* due to spontaneous mutation of *lmg_1816* (*gdpP*) induced by high-temperature growth. *Appl Environ Microbiol*, 78(21), 7753–7759.

-
- Spizizen, J.** (1958). Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 44(10), 1072–1078.
- Stadtmiller, S. S., Gorensek-Benitez, A. H., Guseman, A. J. & Pielak, G. J.** (2017). Osmotic shock induced protein destabilization in living cells and its reversal by glycine betaine. *J Mol Biol*, 429(8), 1155–1161.
- Story, R. M. & Steitz, T. A.** (1992). Structure of the recA protein–ADP complex. *Nature*, 355(6358), 374–376.
- Street, T. O., Bolen, D. W. & Rose, G. D.** (2006). A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc Natl Acad Sci*, 103(38), 13997–14002.
- Tascón, I., Sousa, J. S., Corey, R. A., Mills, D. J., Griwatz, D., Aumüller, N., Mikusevic, V., Stansfeld, P. J., Vonck, J. & Hänel, I.** (2020). Structural basis of proton-coupled potassium transport in the KUP family. *Nat Commun*, 11(1), 626.
- Teichmann, L., Chen, C., Hoffmann, T., Smits, S. H., Schmitt, L. & Bremer, E.** (2017). From substrate specificity to promiscuity: hybrid ABC transporters for osmoprotectants. *Mol Microbiol*, 104(5), 761–780.
- Teichmann, L., Kümmel, H., Warmbold, B. & Bremer, E.** (2018). OpuF, a new *Bacillus* compatible solute ABC transporter with a substrate-binding protein fused to the transmembrane domain. *Appl Environ Microbiol*, 84(20), e01728–18.
- ter Beek, J., Guskov, A. & Slotboom, D. J.** (2014). Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol*, 143(4), 419–435.
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A. & Vollmer, W.** (2011). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol*, 10(2), 123–136.
- Ullmann, A. & Monod, J.** (1968). Cyclic AMP as an antagonist of catabolite repression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 2(1), 57–60.
- Valenzuela-Garcia, L. I., Ayala-Garcia, V. M., Regalado-Garcia, A. G., Setlow, P. & Pedraza-Reyes, M.** (2018). Transcriptional coupling (Mfd) and DNA damage scanning (DisA) coordinate excision repair events for efficient *Bacillus subtilis* spore outgrowth. *Microbiologyopen*, 7(5), e00593.
- van der Heide, T. & Poolman, B.** (2002). ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep*, 3(10), 938–943.
- Walker, J., Saraste, M., Runswick, M. & Gay, N.** (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*, 1(8), 945–951.
- Wang, X., Cai, X., Ma, H., Yin, W., Zhu, L., Li, X., Lim, H. M., Chou, S.-H. & He, J.** (2019). A c-di-AMP riboswitch controlling *kdpFABC* operon transcription regulates the potassium transporter system in *Bacillus thuringiensis*. *Communications Biology*, 2(1).

-
- Warmbold, B., Ronzheimer, S., Freibert, S.-A., Seubert, A., Hoffmann, T. & Bremer, E.** (2020). Two MarR-type repressors balance precursor uptake and glycine betaine synthesis in *Bacillus subtilis* to provide cytoprotection against sustained osmotic stress. *Front Microbiol*, 11.
- Waterhouse, A., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. & Barton, G. J.** (2009). Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. & Schwede, T.** (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*, 46(W1), 296–303.
- Welsh, D. T.** (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev*, 24(3), 263–290.
- Whatmore, A. M. & Reed, R. H.** (1990). Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *J Gen Microbiol*, 136(12), 2521–2526.
- Whatmore, A. M., Chudek, J. A. & Reed, R. H.** (1990). The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol*, 136(12), 2527–2535.
- Whiteley, A. T., Pollock, A. J. & Portnoy, D. A.** (2015). The PAMP c-di-AMP is essential for *Listeria monocytogenes* growth in rich but not minimal media due to a toxic increase in (p)ppGpp. *Cell Host Microbe*, 17(6), 788–798.
- Whiteley, A. T., Garelis, N. E., Peterson, B. N., Choi, P. H., Tong, L., Woodward, J. J. & Portnoy, D. A.** (2017). c-di-AMP modulates *Listeria monocytogenes* central metabolism to regulate growth, antibiotic resistance and osmoregulation. *Mol Microbiol*, 104(2), 212–233.
- Witte, G., Hartung, S., Büttner, K. & Hopfner, K.-P.** (2008). Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Mol Cell*, 30(2), 167–178.
- Wood, J. M.** (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(1), 230–262.
- Yan, X., Yu, H.-J., Hong, Q. & Li, S.-P.** (2008). Cre/lox system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 74(17), 5556–5562.
- Yancey, P., Clark, M., Hand, S., Bowlus, R. & Somero, G.** (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217(4566), 1214–1222.
- Yancey, P. H.** (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol*, 208(15), 2819–2830.
- Ye, S., Li, Y. & Jiang, Y.** (2010). Novel insights into K⁺ selectivity from high-resolution structures of an open K⁺ channel pore. *Nat Struct Mol Biol*, 17(8), 1019–1023.

-
- Zaprasis, A., Hoffmann, T., Wünsche, G., Flórez, L. A., Stülke, J. & Bremer, E.** (2013). Mutational activation of the RocR activator and of a cryptic *rocDEF* promoter bypass loss of the initial steps of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol*, 16(3), 701–717.
- Zaprasis, A., Bleisteiner, M., Kerres, A., Hoffmann, T. & Bremer, E.** (2015). Uptake of amino acids and their metabolic conversion into the compatible solute proline confers osmoprotection to *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 81(1), 250–259.
- Zarrella, T. M., Metzger, D. W. & Bai, G.** (2018). Stress suppressor screening leads to detection of regulation of cyclic di-AMP homeostasis by a Trk family effector protein in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 200(12).
- Zeden, M. S., Schuster, C. F., Bowman, L., Zhong, Q., Williams, H. D. & Gründling, A.** (2018). Cyclic di-adenosine monophosphate (c-di-AMP) is required for osmotic regulation in *Staphylococcus aureus* but dispensable for viability in anaerobic conditions. *J Biol Chem*, 293(9), 3180–3200.
- Zhu, B., Liu, C., Liu, S., Cong, H., Chen, Y., Gu, L. & Ma, L. Z.** (2016). Membrane association of SadC enhances its diguanylate cyclase activity to control exopolysaccharides synthesis and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, 18(10), 3440–3452.

8 Anhang

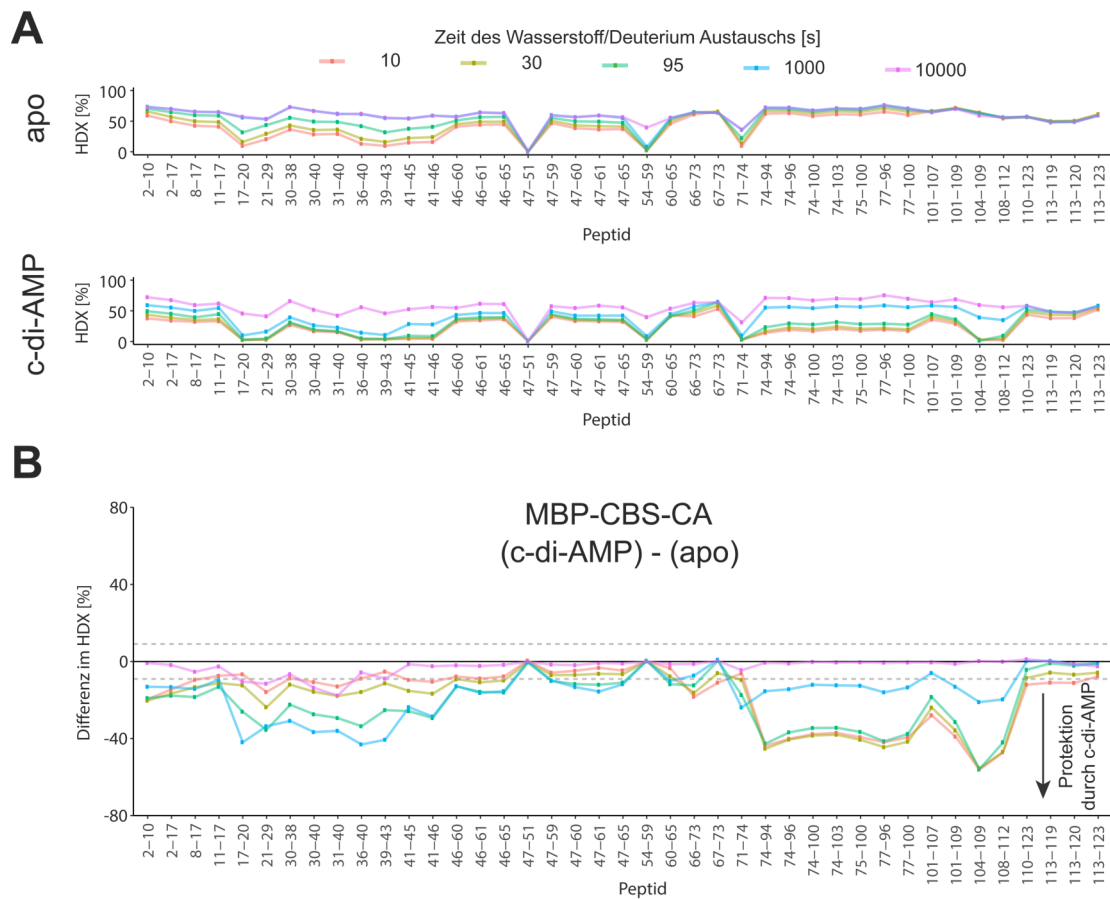


Abbildung 40: Konformationsänderungen durch die Bindung von c-di-AMP an die CBS Domäne von Opu-CA. (A) Relative Wasserstoff/Deuterium (H/D) Austauschprofile des apo- (oben) und des c-di-AMP gebundenen (unten) Zustandes von CBS-CA. **(B)** Konformationsänderungen von CBS-CA ausgedrückt als Differenz der H/D Austauschprofile zwischen dem c-di-AMP gebundenen und dem apo-Zustand. Abbildung modifiziert nach Dr. Wieland Steinchen.

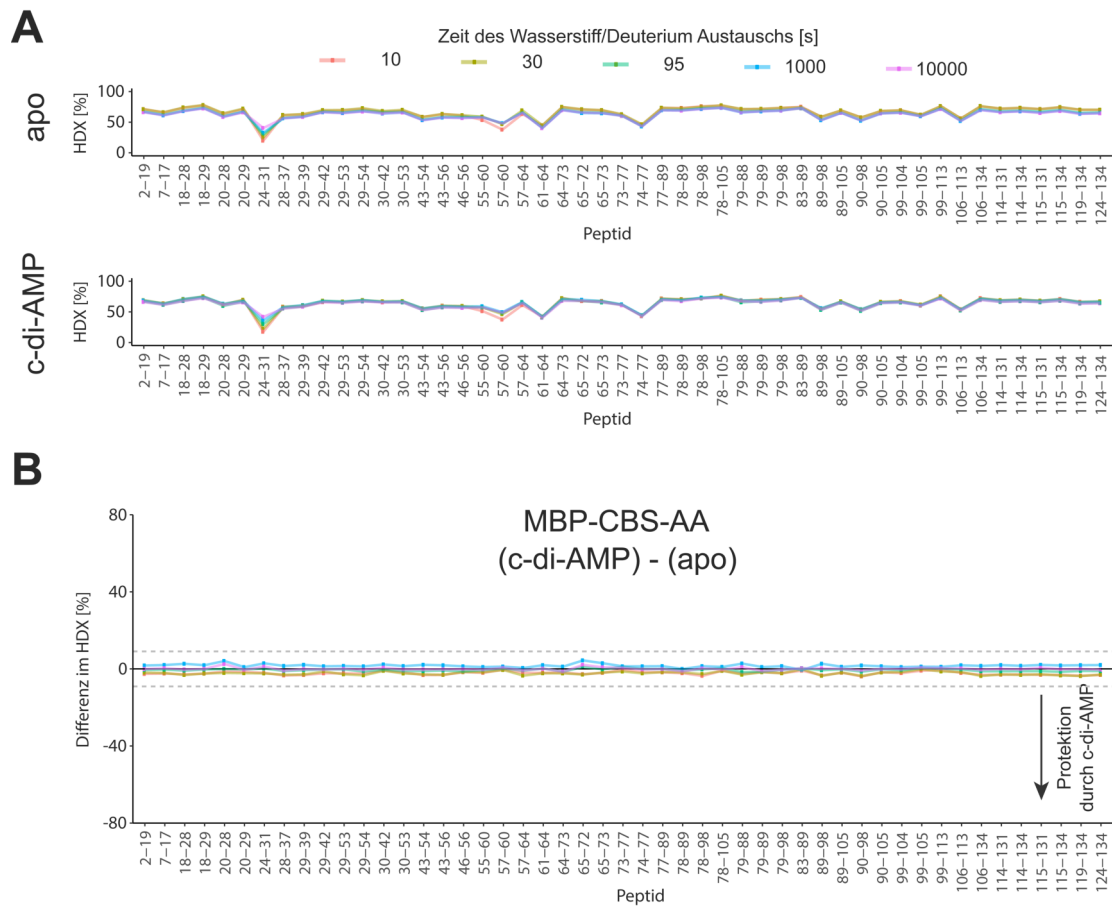


Abbildung 41: Die CBS-Domäne von OpuAA koordiniert kein c-di-AMP. (A) Relative Wasserstoff/Deuterium (H/D) Austauschprofile des apo- (oben) und des c-di-AMP gebundenen (unten) Zustandes von CBS-AA. **(B)** Konformationsänderungen von CBS-AA ausgedrückt als Differenz der H/D Austauschprofile zwischen dem c-di-AMP gebundenen und dem apo-Zustand. Abbildung modifiziert nach Dr. Wieland Steinchen.

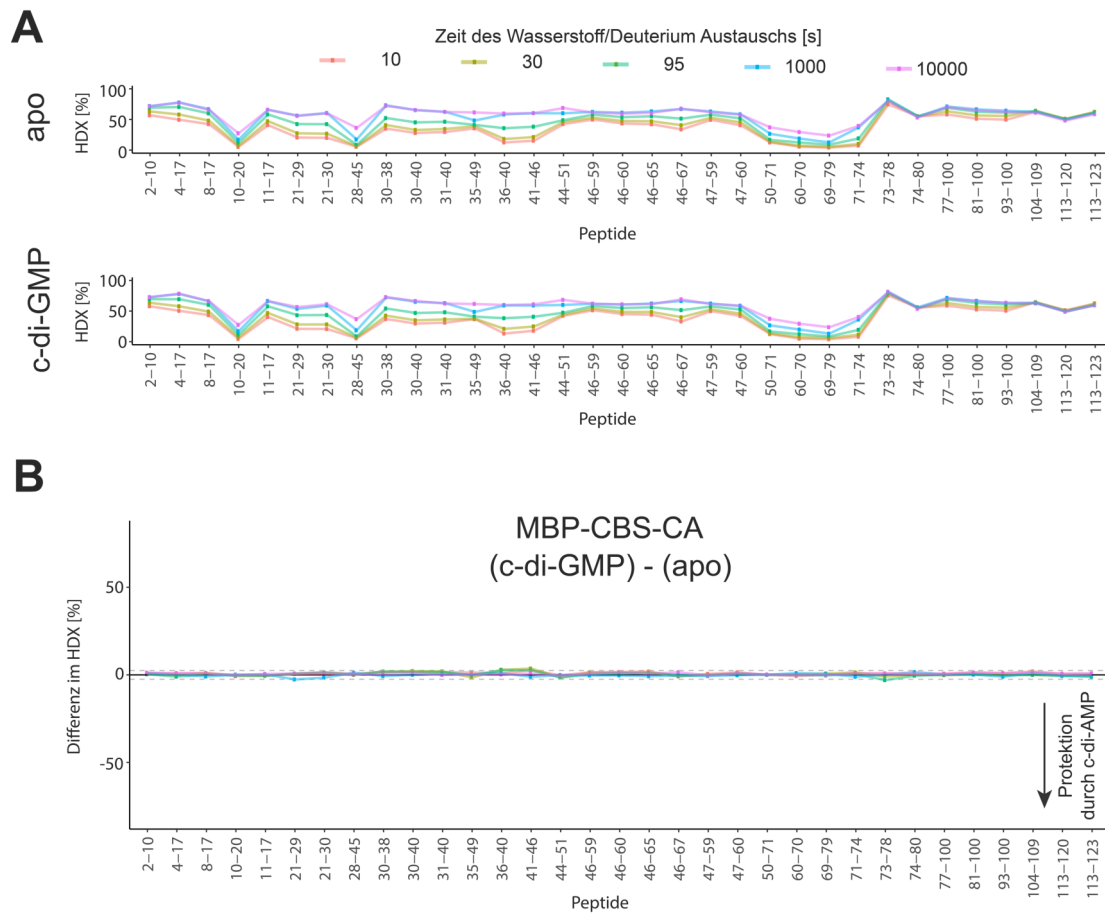


Abbildung 42: Die CBS-Domäne von OpuCA koordiniert kein c-di-GMP. (A) Relative Wasserstoff/Deuterium (H/D) Austauschprofile des apo- (oben) und des c-di-GMP gebundenen (unten) Zustandes von CBS-CA. **(B)** Konformationsänderungen von CBS-CA ausgedrückt als Differenz der H/D Austauschprofile zwischen dem c-di-GMP gebundenen und dem apo-Zustand. Abbildung modifiziert nach Dr. Wieland Steinchen.

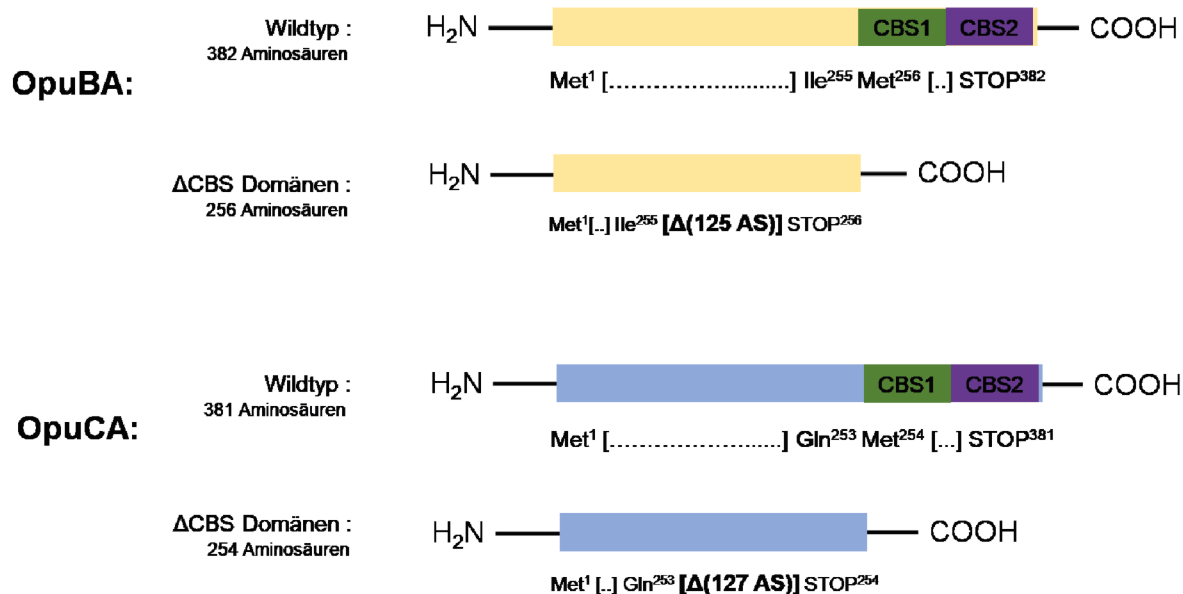


Abbildung 43: Schematische Darstellung der Deletion der CBS Domänen in OpuBA und OpuCA. Dargestellt sind die Wildtyp NBDs OpuBA und OpuCA mit den CBS Domänen 1 und 2 (grün und violett) sowie die NBDs nach der Deletion der Aminosäuren, welche die CBS Domänen bilden.

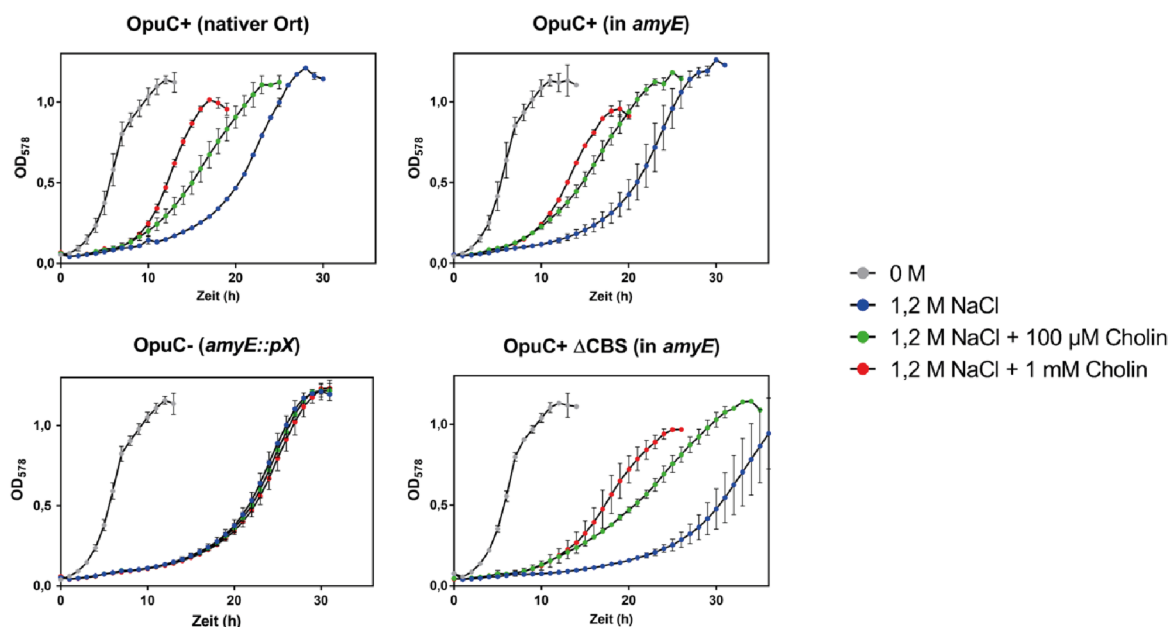


Abbildung 44: Funktion der CBS Domänen für den Transporter OpuC. Wachstumskurven eines Stamms mit dem Transporter OpuC ohne CBS Domäne im Vergleich zum Wildtyp-Transporter. Getestet wurden SMM 0 M, mit 1,2 M NaCl sowie mit dem Zusatz von 100 μM und 1 mM Cholin. Kultivierung der Vorkultur in SMM, Hauptkultur im Mikrotiterplatten-Photometer wurde auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft und das Wachstum über 35 Stunden verfolgt. Standardabweichung von zwei biologischen Parallelen.

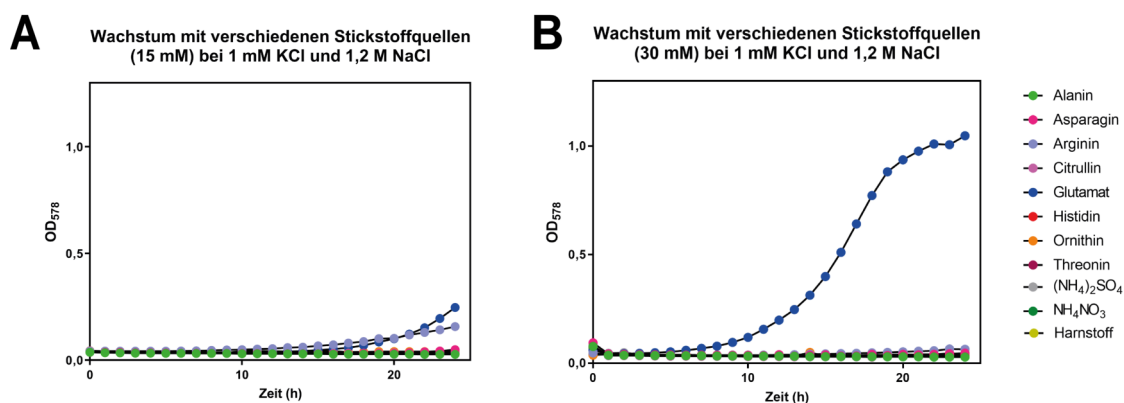


Abbildung 45: Test von verschiedenen Stickstoffquellen beim Wachstum unter osmotischem Stress (1,2 M NaCl). Die Zellen wurden in Natrium-SMM vorkultiviert, auf eine OD_{578} von 0,1 im Mikrotiterplatten-Photometer angeimpft und das Wachstum über 24 Stunden verfolgt. **(A)** Wachstum in Natrium-SMM mit 15 mM verschiedener Stickstoffquellen und 1 mM KCl. **(B)** Wachstum in Natrium-SMM mit 30 mM verschiedener Stickstoffquellen und 1 mM KCl.

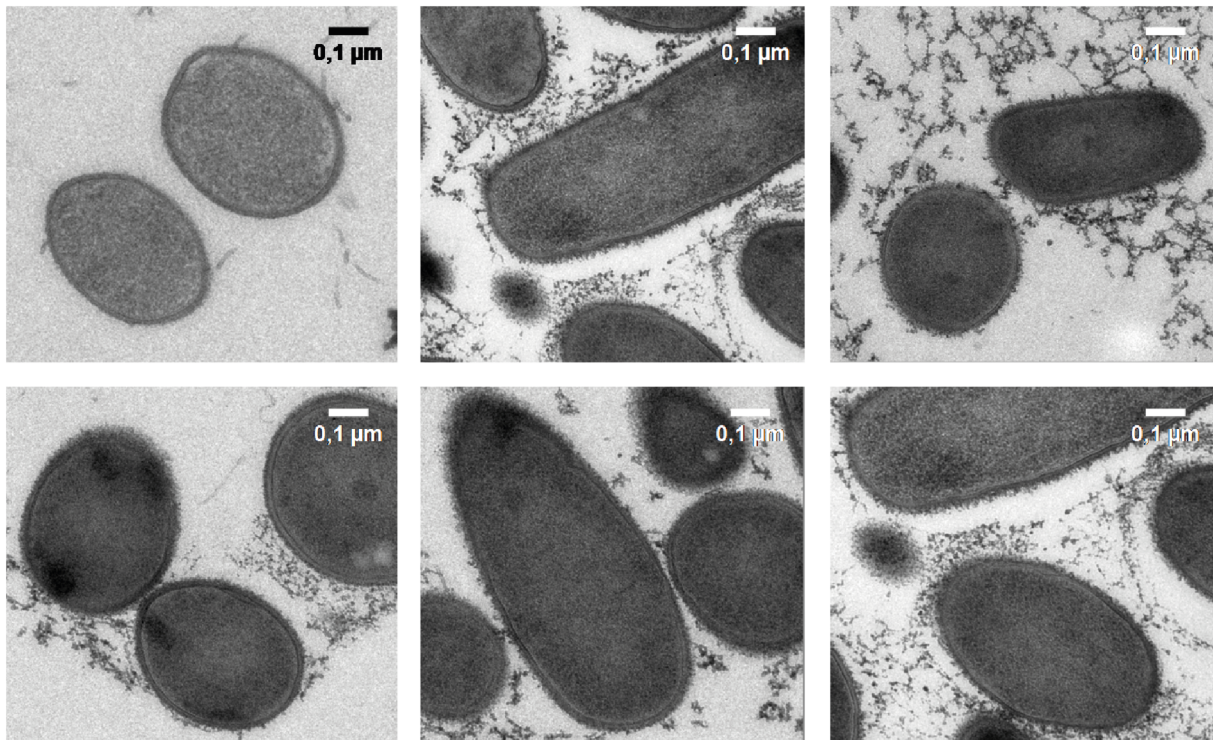


Abbildung 46: TEM Bilder von *B. subtilis* nach Wachstum in SMM. Zellen wurden nach der Kultivierung unter Hochdruck schockgefroren, das Wasser der Zellen gegen eine organische Lösung ausgetauscht, die Zellen in Kunstharz eingebettet und für die Mikroskopie Schnitte davon angefertigt.

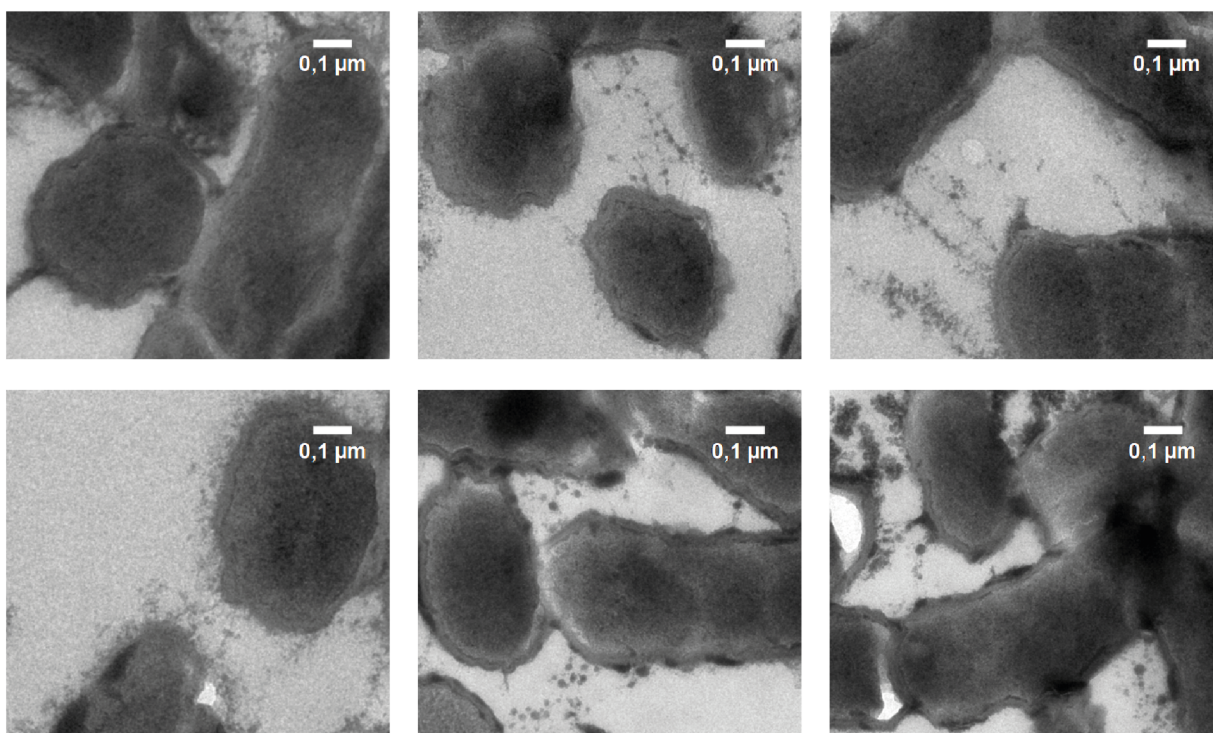


Abbildung 47: TEM Bilder von *B. subtilis* nach Wachstum in SMM + 1 mM Glycinbetain. Zellen wurden nach der Kultivierung unter Hochdruck schockgefroren, das Wasser der Zellen gegen eine organische Lösung ausgetauscht, die Zellen in Kunstharz eingebettet und für die Mikroskopie Schnitte davon angefertigt.

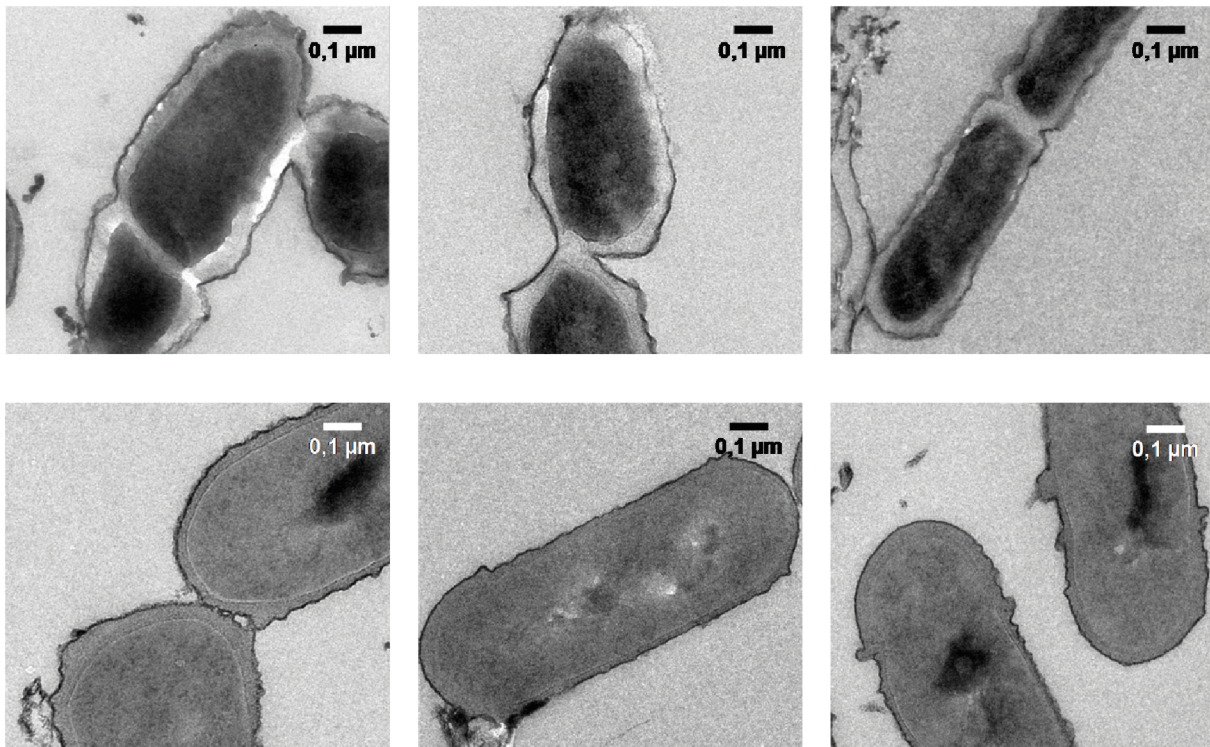


Abbildung 48: TEM Bilder von *B. subtilis* nach Wachstum in SMM + 1,2 M NaCl. Zellen wurden nach der Kultivierung unter Hochdruck schockgefroren, das Wasser der Zellen gegen eine organische Lösung ausgetauscht, die Zellen in Kunstharz eingebettet und für die Mikroskopie Schnitte davon angefertigt. Bilder in der oberen Reihe aus der ersten, Bilder in der unteren Reihe aus der zweiten Präparation.

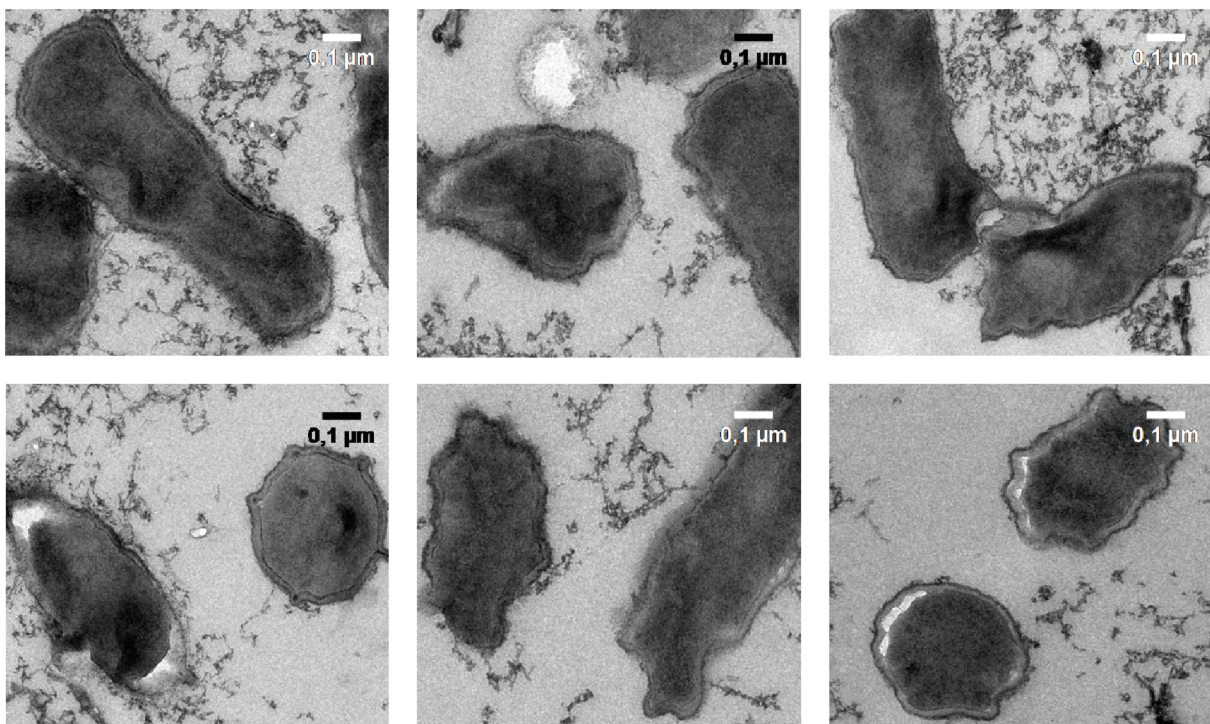


Abbildung 49: TEM Bilder von *B. subtilis* nach Wachstum in SMM + 1,2 M NaCl + 1 mM Glycinbetain. Zellen wurden nach der Kultivierung unter Hochdruck schockgefroren, das Wasser der Zellen gegen eine organische Lösung ausgetauscht, die Zellen in Kunstharz eingebettet und für die Mikroskopie Schnitte davon angefertigt.

9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer** dafür bedanken, dass ich mein Dissertationsprojekt in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten durfte, des Weiteren für die zahlreichen fruchtbringenden wissenschaftlichen Diskussionen und die umfangreiche Betreuung.

Bei **Prof. Dr. Gert Bange** möchte ich mich für die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken.

Besonderer Dank gilt **Dr. Tamara Hoffmann**, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und mir sowohl bei wissenschaftlichen als auch bei privaten Fragen stets zur Seite stand. Dank ihr habe ich während meiner Doktorarbeit auch endlich das Klonieren gelernt. ☺

Außerdem gilt großer Dank **Prof. Dr. Gert Bange** und **Dr. Wieland Steinchen (Willi)** für stets angeregte wissenschaftliche Diskussionen und den neuen Einblick in die Welt der Proteine. Willi danke ich außerdem für die Durchführung und Auswertung der HDX-Experimente.

Des Weiteren möchte ich mich bei **Dr. Sven-Andreas Freibert** von der AG Lill bedanken für die Einführung in die Welt der Thermophorese und des Octets sowie für die zahlreichen Auswertungen meiner gefühlt 1000 Messungen.

Bei **Dr. Karl-Heinz Rexer** und **Petra** (ehem. AG Kost) sowie bei **Dr. Thomas Heimerl** (AG Maier) möchte ich mich für die Vorbereitung meiner Proben sowie für die Unterstützung beim Mikroskopieren am REM und TEM bedanken.

Bei **Annette, Anna Lena** und **Niklas** von der ZFA Metabolomics der Medizinischen Hochschule Hannover möchte ich mich für die stets schnelle Messung meiner c-di-AMP Proben und den allzeit netten Kontakt bedanken.

Außerdem gilt mein Dank **Timothee Pilarski**, der im Rahmen seiner Bachelorarbeit zahlreiche CBS-Mutanten erstellt und produziert hat.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei **Jutta, Daniela** und **Jochen**, den geheimen Superkräften der AG Bremer. **Jutta** und **Daniela** haben mir gezeigt, wie man mit *Bacillus* Freundschaft schließt und haben so einige meiner Experimente gerettet. Vielen Dank an Jochen für die zahlreichen Proteinproduktionen und -reinigungen sowie die Unterstützung, wenn es mal wieder eine Havarie an der Gefi oder am PC gab.

Vielen Dank an **Laura (Teichfrau ☺)**, **Sarah**, **Alex** und die Office-Queens **Nelli & Svenja** für die gemeinsame Zeit und für die seelische und moralische Unterstützung, wenn es mal nicht so lief mit den Experimenten. Auch bei den restlichen Mitgliedern der AG Bremer möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und die stets angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meinem Mann **Mathias** möchte ich dafür danken, dass er seit über 7 Jahren bedingungslos an meiner Seite ist, mit mir durch sämtliche Höhen und Tiefen meines Studiums gegangen ist und mich vor allem in den letzten 3,5 Jahren mehr als einmal motiviert hat weiterzumachen und niemals aufzugeben.

Der größte Dank gilt **meinen Eltern** für die großartige Unterstützung während meines Studiums und meiner Doktorarbeit. Auch wenn uns seit meinem Masterstudium viele Kilometer getrennt haben, ihr wart und seid immer für mich da.

10 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Osmotisch bedingter Stress in *Bacillus subtilis*
- C-di-AMP, der Regulator für die Aufnahme osmotischer Schutzsubstanzen?**

selbständig verfasst, keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Es wurde von mir bisher noch keine Dissertation versucht.

.....
Doreen Hinkel

.....
Ort, Datum